

**Synthese von Derivaten des Indirubins
und Untersuchungen zur
Mechanismusaufklärung
ihrer antineoplastischen Wirkung**

vom Fachbereich Chemie
der Universität Kaiserslautern
zur Erlangung des akademischen Grades
"DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN"
genehmigte Dissertation
(D386)

vorgelegt von
Diplom Chemiker
Ralph Hössel

Betreuer: **Prof. Dr. G. Eisenbrand**

Kaiserslautern 1999

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: **8. Juni 1999**

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. R. Wortmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Eisenbrand

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Regitz

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Juli 1995 und Juli 1998 im Fachbereich Chemie,
Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie
der Universität Kaiserslautern

Herrn Prof. Dr. G. Eisenbrand danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und seine ständige Diskussionsbereitschaft und wohlwollende Unterstützung während meiner Promotionszeit.

Herrn Prof. Dr. M. Regitz danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. R. Wortmann danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Für Axel

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-------------|
| Inhaltsverzeichnis | v |
| Abkürzungsverzeichnis | viii |
| Aminosäuren und ihre Symbole | ix |
| Von der IUPAC-Nomenklatur abweichende Benennungen | ix |
| 1 Einleitung | 1 |
| 2 Grundlagen | 9 |
| 2.1 Indirubin und seine Isomeren | 9 |
| 2.1.1 Synthesen von Indirubin (11) | 9 |
| 2.1.2 Synthesen von Derivaten des Indirubins | 11 |
| 2.1.3 Synthesen von Indigo und Isoindigo..... | 14 |
| 2.1.3.1 Indigo (12) | 14 |
| 2.1.3.2 Isoindigo (13)..... | 17 |
| 2.1.4 Biologische Aktivität von Derivaten des Indirubins und seiner Isomeren | 18 |
| 2.1.4.1 Wirksamkeit gegen Tumoren | 18 |
| 2.1.4.2 Subakute Toxizität, Resorption | 20 |
| 2.1.4.3 Untersuchungen zum Wirkmechanismus | 21 |
| 2.2 Weitere Bisindolderivate | 23 |
| 2.2.1 Synthesen | 23 |
| 2.2.2 Biologische Aktivität | 24 |
| 2.3 Der Zellzyklus | 25 |
| 2.4 Cyclinabhängige Kinasen (CDK) | 26 |
| 2.4.1 Regulation | 28 |
| 2.4.2 Enzymkomplex CDK1/Cyclin B | 29 |
| 2.4.3 Hemmstoffe | 31 |
| 2.4.3.1 Identifizierung | 32 |
| 2.4.3.2 Strukturen, Wirkstärken, Selektivität..... | 32 |
| 2.4.3.3 Röntgenstrukturanalyse (RSA)..... | 37 |
| 2.4.3.4 Wirkung von CDK-Inhibitoren auf die Zelle | 39 |
| 2.4.3.5 Apoptose | 40 |
| 2.4.3.6 Verwendung als molekulare Werkzeuge..... | 42 |
| 2.4.3.7 Verwendung als Therapeutika | 42 |
| 2.4.3.7.1 Krebs..... | 43 |
| 2.4.3.7.2 Alzheimersche Krankheit..... | 44 |
| 2.5 Cyclovoltammetrie | 45 |
| 2.6 Interkalation in die DNA | 45 |
| 2.7 Colony-Forming-Assay | 46 |
| 2.8 Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient | 47 |
| 3 Problemstellung | 49 |
| 4 Ergebnisse und Diskussion | 50 |
| 4.1 Synthese der Isatin- und Indirubinderivate | 50 |
| 4.1.1 1-Methylindirubin (25) | 52 |
| 4.1.2 1-Phenylindirubin (28)..... | 54 |
| 4.1.3 5-Bromindirubin (31)..... | 58 |
| 4.1.4 5-Chlorindirubin (33)..... | 60 |
| 4.1.5 5-Fluorindirubin (62)..... | 62 |
| 4.1.6 5-Methylindirubin (36) | 64 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 4.1.7 | 5-Nitroindirubin (65) | 66 |
| 4.1.8 | 5'-Bromindirubin (67) | 68 |
| 4.1.9 | 5,5'-Dibromindirubin (68) | 71 |
| 4.1.10 | Indirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (29b) | 73 |
| 4.1.11 | 5'-Bromindirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz, Dihydrat) (69a) | 75 |
| 4.1.12 | 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonylchlorid (70) | 77 |
| 4.1.13 | Isatin-5-sulfonamid (71) | 77 |
| 4.1.14 | Indirubin-5-sulfonamid (72) | 79 |
| 4.1.15 | Isatin-5-sulfonsäuremethylamid (74) | 82 |
| 4.1.16 | Indirubin-5-sulfonsäuremethylamid (75) | 84 |
| 4.1.17 | 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonsäure(dimethyl)amid (76) | 86 |
| 4.1.18 | Isatin-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid (77) | 87 |
| 4.1.19 | Indirubin-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid (78) | 89 |
| 4.1.20 | Isatin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid (81) | 91 |
| 4.1.21 | Indirubin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid (82) | 92 |
| 4.1.22 | Isatin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid (85) | 95 |
| 4.1.23 | Indirubin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid (86) | 97 |
| 4.1.24 | Indirubin-3'-oxim (87) | 101 |
| 4.1.25 | 5-Iodindirubin-3'-oxim (91) | 107 |
| 4.1.26 | 3'-Hydroxyiminoindirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (92a) | 110 |
| 4.2 | Synthese von Isoindigo (13) | 113 |
| 4.3 | Zusammenstellung der NMR-Daten der Indirubinderivate und des Isoindigos | 116 |
| 4.4 | Weitere Synthesen | 119 |
| 4.4.1 | <i>N,N'</i> -Di- <i>o</i> -tolyloxamid (45) | 119 |
| 4.4.2 | 2,2'-Bisindol (46) | 120 |
| 4.4.3 | <i>N,N'</i> -Bis(2-benzoylphenyl)-oxamid (47) | 121 |
| 4.4.4 | 3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol (48) | 122 |
| 4.5 | Cyclovoltammetrie | 124 |
| 4.6 | Ethidiumbromidverdrängungsassay | 130 |
| 4.7 | Die Hemmung des Enzymkomplexes CDK1/Cyclin B | 133 |
| 4.8 | Colony-Forming-Assay / Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus | 137 |
| 4.8.1 | Ergebnisse des Colony-Forming-Assays | 137 |
| 4.8.2 | Beteiligung der Interkalation am Wirkmechanismus | 149 |
| 4.8.3 | Beteiligung der Hemmung von CDK1/Cyclin B am Wirkmechanismus | 149 |
| 4.9 | Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient, Lipophilie-Wirkungs-Abhängigkeit | 150 |
| 4.10 | Luciferase-Assay | 152 |
| 4.11 | Sulforhodamin B-Assay | 153 |
| 4.12 | Erste <i>in vivo</i>-Versuche an der Nacktmaus | 155 |
| 4.13 | Röntgenstrukturanalytische Untersuchungen an CDK2 | 160 |
| 5 | Zusammenfassung | 172 |
| 6 | Experimenteller Teil | 175 |
| 6.1 | Geräte und Materialien | 175 |
| 6.2 | Synthesen | 175 |
| 6.2.1 | Isatin- und Indirubinderivate | 175 |
| 6.2.1.1 | 1-Methylindirubin (25) | 176 |
| 6.2.1.2 | 1-Phenylindirubin (28) | 177 |
| 6.2.1.3 | 5-Bromindirubin (31) | 178 |
| 6.2.1.4 | 5-Chlorindirubin (32) | 179 |
| 6.2.1.5 | 5-Fluorindirubin (62) | 180 |
| 6.2.1.6 | 5-Methylindirubin (36) | 181 |
| 6.2.1.7 | 5-Nitroindirubin (65) | 182 |
| 6.2.1.8 | 5'-Bromindirubin (67) | 183 |
| 6.2.1.9 | 5,5'-Dibromindirubin (68) | 185 |
| 6.2.1.10 | Indirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (29b) | 186 |
| 6.2.1.11 | 5'-Bromindirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz, Dihydrat) (69a) | 187 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 6.2.1.12 | 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonylchlorid (70)..... | 187 |
| 6.2.1.13 | Isatin-5-sulfonamid (71)..... | 187 |
| 6.2.1.14 | Indirubin-5-sulfonamid (72)..... | 189 |
| 6.2.1.15 | Isatin-5-sulfonsäuremethyramid (74)..... | 189 |
| 6.2.1.16 | Indirubin-5-sulfonsäuremethyramid (75)..... | 190 |
| 6.2.1.17 | 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid (76)..... | 191 |
| 6.2.1.18 | Isatin-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid (77)..... | 192 |
| 6.2.1.19 | Indirubin-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid (77)..... | 192 |
| 6.2.1.20 | Isatin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid (81)..... | 193 |
| 6.2.1.21 | Indirubin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid (82)..... | 194 |
| 6.2.1.22 | Isatin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid (85)..... | 195 |
| 6.2.1.23 | Indirubin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid (86)..... | 196 |
| 6.2.1.24 | Indirubin-3'-oxim (87)..... | 197 |
| 6.2.1.25 | 5-Iodindirubin-3'-oxim (91)..... | 198 |
| 6.2.1.26 | 3'-Hydroxyiminoindirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (92a)..... | 200 |
| 6.2.2 | Isoindigo (13)..... | 200 |
| 6.2.3 | Weitere..... | 201 |
| 6.2.3.1 | <i>N,N'</i> -Di- <i>o</i> -tolylloxalamid (45)..... | 201 |
| 6.2.3.2 | 2,2'-Bisindol (46)..... | 202 |
| 6.2.3.3 | <i>N,N'</i> -Bis(2-benzoylphenyl)-oxamid (47)..... | 204 |
| 6.2.3.4 | 3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol (48)..... | 205 |
| 6.3 | Analysen..... | 207 |
| 6.4 | Cyclovoltammetrie..... | 207 |
| 6.5 | Ethidiumbromidverdrängungsassay..... | 207 |
| 6.6 | Enzyme des Zellzyklus..... | 208 |
| 6.7 | Colony-Forming-Assay..... | 208 |
| 6.8 | Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten, Lipophilie-Wirkungs-Abhängigkeit..... | 209 |
| 6.8.1 | Geräte und Einstellungen..... | 209 |
| 6.8.2 | Phosphatpuffer..... | 210 |
| 6.8.3 | Ausschütteln..... | 210 |
| 6.8.4 | Ausschütteln bei Indirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (29b) und 5'-Bromindirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (69a)..... | 210 |
| 6.8.5 | Gehaltsbestimmung..... | 210 |
| 6.8.6 | Berechnung des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten..... | 211 |
| 6.8.7 | Lipophilie-Wirkungs-Abhängigkeit..... | 211 |
| 6.9 | Sulforhodamin B-Assay..... | 211 |
| 6.10 | <i>In vivo</i>-Untersuchungen..... | 211 |
| 6.11 | Röntgenstrukturanalytische Untersuchungen an CDK2..... | 212 |
| 7 | Literaturverzeichnis..... | 213 |
| 8 | Anhang..... | 232 |
| 8.1 | Weitere NMR-Spektren..... | 232 |
| 8.1.1 | Indirubin (11)..... | 232 |
| 8.1.2 | 5-Iodindirubin (90)..... | 233 |
| 8.1.3 | Indigo (12)..... | 234 |
| 8.1.4 | Natriumsalz der Isatin-5-sulfonsäure (27b)..... | 235 |
| 8.2 | Substanznummern..... | 236 |
| | Veröffentlichung aus dieser Arbeit..... | 238 |
| | Dank..... | 239 |
| | Lebenslauf..... | 240 |

Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|-------------------|---|---------------------|---|
| AD | Alzheimersche Krankheit (<i>Alzheimer's Disease</i>) | <i>i</i> | <i>ipso</i> |
| APC | Anaphase-Förderkomplex (<i>anaphase-promoting complex</i>) | i.p. | intra ^u peritoneal (in die / in der Bauchhöhle) |
| APP | Amyloid-Vorläufer-Protein (<i>amyloid precursor protein</i>) | IC ₅₀ | Konzentration einer Substanz, die eine 50 %ige Wachstumshemmung einer Zellkultur im Vergleich zu einem unbehandelten Kontrollansatz bewirkt |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat | I-R | Insulinrezeptor-Tyrosinkinase |
| BXF | humaner Blasen-tumorxenograft | i.v. | intra ^u venös |
| CAK | CDK aktivierende Kinase | KAP | CDK-assoziierte Phosphatase, auch Cdi 1 |
| CDCI ₃ | deuteriertes Chloroform | KOH | Kaliumhydroxid |
| cdc | Zellteilungszyklus (<i>cell division cycle</i>) | L7212 | Leukämiezelllinie |
| cdc2 | Enzym 2 des Zellteilungszyklus (<i>cell division cycle 2</i> , identisch mit CDK1) | log P _{ow} | dekadischer Logarithmus des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten |
| Cdi 1 | Mit CDK wechselwirkende Phosphatase (<i>cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase 1</i>), identisch mit KAP | LXFA | humaner Tumorxenograft: Adenokarzinom der Lunge |
| CDK | Cyclinabhängige Kinase (<i>cyclin dependent kinase</i>) | LXFL | humaner Tumorxenograft: großzelliges Lungenkarzinom |
| CDK1 | Cyclinabhängige Kinase 1 (<i>cyclin dependent kinase 1</i> , identisch mit cdc2) | LXFS | humaner Tumorxenograft: kleinzelliges Lungenkarzinom |
| CKI | Inhibitor cyclinabhängiger Kinasen (<i>Cyclin dependent kinase inhibitor</i>) | <i>m</i> | <i>meta</i> |
| Cip1 | mit CDKs wechselwirkendes Protein 1 (<i>CDK-interacting protein 1</i>), identisch mit Waf1 | MAPK | Mitogen aktivierbare Proteinkinase |
| CML | chronisch myeloische Leukämie | MAXF | humaner Brusttumorxenograft |
| CXF | humaner colorectaler Tumorxenograft | MEXF | humaner Tumorxenograft: Melanom |
| d | Dublett | min | Minute(n) |
| dd | Doppeldublett | MPF | M-Phase-Förderfaktor (<i>M-phase promoting factor</i>) |
| DEPT | Verzerrungsfreie Verstärkung durch Polarisationstransfer (<i>Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer</i>) | n | normal |
| DME | Dimethoxyethan | nb | nicht bestimmt |
| DMF | Dimethylformamid | NFT | Neurofibrillenbündel (<i>Neurofibrillary Tangles</i>) |
| DMSO | Dimethylsulfoxid | <i>o</i> | <i>ortho</i> |
| dt | Doppeltriplett | OVXF | humaner Ovarialtumorxenograft |
| ED ₅₀ | Konzentration, bei der 50 % eines maximal möglichen Effekts eintritt (Effektive Dosis) | <i>p</i> | <i>para</i> |
| EE | Essigsäureethylester | <i>p,p'</i> -DDE | <i>p,p'</i> -Dichlordiphenyldichlorethen |
| EGF | Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>Epidermal growth factor</i>) | PAXF | humaner Pankreastumorxenograft |
| EGF-R | EGF-Rezeptor (Tyrosinkinase) | PE (40-70) | Petrolether mit einem Siedebereich von 40 – 70° C |
| ERE | estrogenkontrollierter Promotor (<i>estrogen responsive element</i> oder <i>estrogen regulatory element</i>) | PHF | Hyperphosphorylierte proteinartige Aggregate (<i>Paired Helical Filaments</i>) |
| et al. | und andere (<i>et alii</i>) | PKA | cAMP-abhängige Proteinkinase (Proteinkinase A) |
| | | PKG | cGMP-abhängige Proteinkinase (Proteinkinase g) |
| | | pt | Pseudotriplett |
| | | q | Quartett |
| | | QSAR | quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehung (<i>quantitative structure activity relationship</i>) |

| | | | |
|----------------------|--|------|--|
| RSA | <u>R</u> öntgen <u>s</u> trukturanalyse | TCA | Trichloressigsäure (trichloroacetic acid) |
| RXF | humaner Nierentumorxenograft | TMS | <u>T</u> etramethylsilan |
| s | <u>S</u> ingulett | W256 | maligne Zelllinie (Walker-Karzinomsarkom) |
| sek | Sekunde(n) | W258 | maligne Zelllinie (Walker-Karzinomsarkom) |
| SRB | <u>S</u> ulforhodamin <u>B</u> | Waf1 | vom Wildtyp-p53 aktiviertes Fragment 1 (<i>wild type p53-activated fragment 1</i>), identisch mit Cip1 |
| t | <u>T</u> riplett | XF | Xenograft |
| T/C | Anzahl der Kolonien in den behandelten Proben dividiert durch die Anzahl der Kolonien in den unbehandelten Proben (<i>treated / control</i>) | | |
| (TBA)PF ₆ | <u>T</u> etra- <i>n</i> - <u>b</u> utylammonium-hexafluorophosphat | | |

Aminosäuren und ihre Symbole

| | | | | | |
|--------|----------------|--------|-----------|--------|------------|
| A, Ala | Alanin | I, Ile | Isoleucin | S, Ser | Serin |
| C, Cys | Cystein | K, Lys | Lysin | T, Thr | Threonin |
| D, Asp | Asparaginsäure | L, Leu | Leucin | V, Val | Valin |
| E, Glu | Glutaminsäure | M, Met | Methionin | W, Trp | Tryptophan |
| F, Phe | Phenylalanin | N, Asn | Asparagin | Y, Tyr | Tyrosin |
| G, Gly | Glycin | P, Pro | Prolin | | |
| H, His | Histidin | Q, Gln | Glutamin | | |
| | | R, Arg | Arginin | | |

Von der IUPAC-Nomenklatur abweichende Benennungen

| <u>Trivialname</u> | <u>IUPAC-Benennung</u> |
|--------------------|--|
| Indirubin | 2,3'-Bis(2,3-dihydroindolylden)-2',3'-dion |
| Indigo | 2,2'-Bis(2,3-dihydroindolylden)-3,3'-dion |
| Isoindigo | 3,3'-Bis(2,3-dihydroindolylden)-2,2'-dion |
| Indoxyl | Indol-3-ol |
| Indoxylacetat | Indol-3-ylacetat oder 3-Acetoxyindol |
| Isatin | 2,3-Dihydroindol-2,3-dion |
| Oxindol | 2,3-Dihydroindol-2-on |

1 Einleitung

Das rotviolette Indirubin (**11**) ist ein Isomeres des blauen Indigos (**12**) und des braunroten Isoindigos (**13**). Unterschiedliche Spezies, zum Beispiel der Färberwaid (*Isatis tinctoria*), *Indigofera tinctoria* (**Abb. 1**) oder einige Schneckenarten (**Abb. 2** und **Abb. 4**) bilden natürliche Vorläufersubstanzen, aus denen die drei Isomeren oder deren Derivate entstehen. Die indigoiden Verbindungen selbst kommen in den lebenden Organismen nicht vor, sondern entstehen erst aus dem toten Material durch enzymatische oder saure Hydrolyse unter oxidativen Bedingungen (Epstein, 1967; Schraudolf, 1968; Fouquet und Bielig, 1971; Gelius, 1980; Dealler et al., 1988; Tang und Eisenbrand, 1992; Falbe und Regitz, 1995; Minami et al., 1997; Yoshikawa et al., 1998). Neben Indigo entsteht Indirubin auch durch die Einwirkung bestimmter Bakterien auf das sogenannte metabolische Indican oder Indoxylsulfat (**4**), das in Folge eines gestörten Tryptophanabbaus (Indicanurie) in größeren Mengen im Urin nierenkranker Patienten entstehen kann und zu einer Violett- oder Blaufärbung des Urins führt (Laatsch und Ludwig-Köhn 1986, Dealler et al., 1988; Arnold, 1996). Einige Vorläufersubstanzen, die alle Derivate des Indoxyls (**9**) darstellen, sind im Reaktionsschema in **Abb. 3** gezeigt. Als Zwischenstufen bei der Entstehung der indigoiden Farbstoffe treten Indoxylderivate mit freier Hydroxygruppe sowie Isatinderivate auf.



Abb. 1: *Indigofera tinctoria* (links) und der Färberwaid (*Isatis tinctoria* rechts) bilden die Vorläufersubstanzen Indican (**1**) bzw. Isatan B (**2**), aus denen durch enzymatische oder saure Hydrolyse unter Einwirkung von Luftsauerstoff Indigo (**12**) und in geringeren Mengen Indirubin (**11**) und Isoindigo (**13**) entstehen (siehe **Abb. 3**) (Epstein, 1967; Schraudolf, 1968; Gelius, 1980; Tang und Eisenbrand, 1992; Falbe und Regitz, 1995; Minami et al., 1997).



Abb. 2: Purpurschnecke *Murex brandaris*. Diese und andere *Murex*-Arten bilden die Vorläufersubstanz Tyr-indoxylsulfat (**5**) und andere bromierte, schwefelhaltige Indoxylderivate, aus denen durch den Einfluß des Enzyms Purpurase und unter Einwirkung von Luftsauerstoff und Licht vor allem Derivate des Indigos entstehen (siehe **Abb. 3**) (Fouquet und Bielig, 1971).

Indigoide Farbstoffe gehören zu den ältesten Begleitern der menschlichen Geschichte und spielten in den verschiedensten Kulturen eine wichtige Rolle. Der uns geläufige Namen "Indigo" stammt aus dem Griechischen. Die Alten Griechen nannten den Farbstoff nach seiner ostindischen Heimat *indikón* (griechisch für "das Indische"). Über das lateinische *indicum* gelangte der Name ins Mittelhochdeutsche (*indich*), um im 17. Jahrhundert der spanischen Form *indigo* Platz zu machen, die sich endgültig einbürgerte. (Drosdowski et al., 1963). Julius Caesar und Plinius dem Älteren zufolge färbten die Einwohner Britanniens ihre Haut mit dem aus Färberwaid gewonnenen Farbstoff, vermutlich um eindrucksvoller auf ihre Feinde zu wirken. Der älteste Eintrag in der *Beilstein-Datenbank* stammt aus dem Jahr 1771. In dem dazugehörigen Artikel wird berichtet, wie mit einer Lösung von Indigo in Schwefelsäure Textilien blau gefärbt wurden, und wie durch Behandeln von Indigo mit Salpetersäure ein gelber Farbstoff erzeugt wurde und zum Färben von Wolle und Seide benutzt werden konnte (Woulfe, 1771). Indigo wurde dabei wahrscheinlich zu dem gelben Farbstoff Isatin (**10**) oxidiert. Aber schon in der Bronzezeit wurde Indigo als Textilfärbemittel eingesetzt. Der aus dem Färberwaid gewonnene Farbstoff wurde in weiten Teilen Europas gewonnen. Die Hauptproduktionszentren waren Albi und Toulouse in Frankreich, Somerset in Großbritannien, Thüringen in Deutschland und Florenz in Italien. Traditionelle Färber weichten zum Bläuen ihre Stoffe in der Küpe ein, während sie selbst sich ausruhten – bevorzugt am Montag: Sie machten blau!

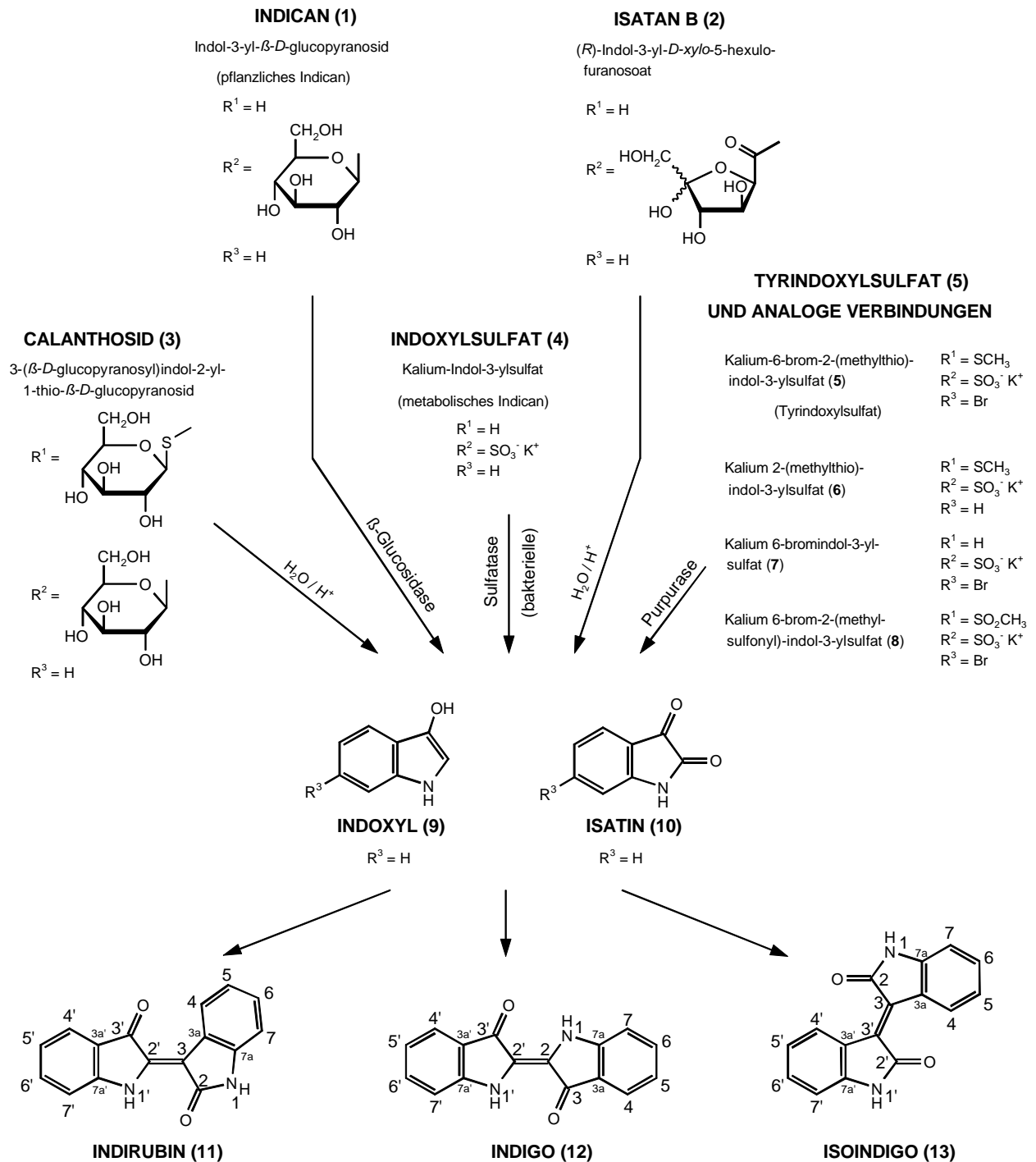
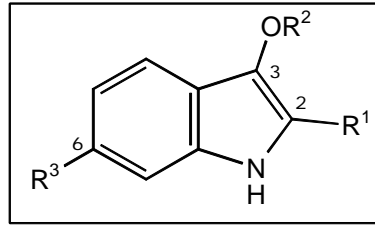


Abb. 3: Aus verschiedenen natürlichen Indoxyl-Vorläufersubstanzen werden durch enzymatische oder saure Hydrolyse die entsprechenden Indoxyl-derivate mit freier Hydroxygruppe gewonnen, die anschließend unter oxidativem Einfluß zu Isatin (10) und den drei Isomeren Indirubin (11), Indigo (12) und Isoindigo (13) weiterreagieren (Schunk, 1855; Epstein, 1967; Schraudolf, 1968; Fouquet und Bielg, 1971; Gelius, 1980; Laatsch, 1986; Dealler et al., 1988; Falbe und Regitz, 1995; Arnold, 1996; Minami et al., 1997; Yoshikawa et al., 1998). Die Pfeile stellen keine Reaktionspfeile im engeren Sinne dar.

Auch in der mittelamerikanischen Kultur der Maya wurde Indigo verwendet. Die bis vor kurzem rätselhaft langlebige und selbst gegenüber dem aggressiven tropischen Klima resistente blaue Farbe der Maya ist neueren Erkenntnissen zufolge durch das Erhitzen eines Tonminerals (*Palygorskit*-Lehm) mit Indigo entstanden. Die Ausbildung einer Art Interkalation von Indigomolekülen in die Feinstruktur des Minerals erklärt die Resistenz gegen Säuren und biologischen Abbau. Der Indigo stammte wahrscheinlich aus einer Pflanze namens *Xiuquilit*, die den *Indigofera*-Arten zuzurechnen ist (José-Yacamán et al., 1996).

Eine Quelle bromierter Indigoderivate sind marine Purpurschnecken (*Murex trunculus*, **Abb. 4**; *Murex brandaris*, **Abb. 2**; *Murex purpura*, und andere Arten). In vielen Teilen der Welt wurde aus diesen Meeresorganismen ein Farbstoff erzeugt, der am Mittelmeer als Tyrischer Purpur bekannt war. Der Farbstoff bildet sich unter dem Einfluß der Purpurase und der Einwirkung von Luftsauerstoff und Licht auf die autolysierten Purpurdrüsen (**Abb. 3**). Es entsteht dabei hauptsächlich 6,6'-Dibromindigo mit Beimengungen verschiedener anderer Indigo- und Indirubinderivate. Für ein Gramm Purpur benötigte man 8.000 Purpurschnecken (Fouquet und Bielig, 1971).

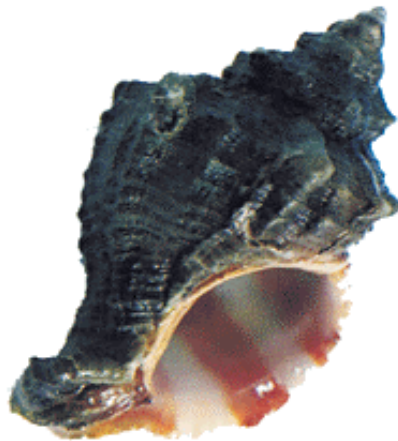


Abb. 4: *Murex trunculus*

Die europäische Indigoproduktion brach im 16. Jahrhundert innerhalb weniger Jahrzehnte zusammen, als die Einführung des Farbstoffs aus Indien begann. Der Indigo wurde dort im Vergleich zum Färberwaid in wesentlich höheren Ausbeuten aus der Fabaceae *Indigofera tinctoria* (**Abb. 5**) und später auch aus anderen *Indigofera*-Arten in der Karibik und den amerikanischen Kolonien gewonnen (Berkeley, 1961). Die Anwesenheit einer kleinen und veränderlichen Beimischung des roten Farbstoffs Indirubin im Indigo bewirkte dabei eine gewisse Variation in den Blautönen. Dieser neue Handel brach wiederum zusammen, als Adolf von Baeyer 1878 nach jahrzehntelangen Forschungen die Total-synthese des Indigo, ausgehend von 2-Phenyllessigsäure (**37**) gelang (Baeyer, 1878 a-c). Ein weiterer Syntheseweg ging vom preisgünstig aus Steinkohlenteer zu gewinnenden Anilin (**40**) aus (Heumann, 1890 a und b; Pflieger, 1901). Dies führte dazu, daß bereits 20 Jahre später Indigo fast ausschließlich industriell erzeugt wurde. Nach einer Absatzflaute erlebte die Indigoproduktion in der zweiten Hälfte

dieses Jahrhunderts wegen der in Mode gekommenen Blue Jeans wieder einen starken Auftrieb (Blue Jeans - *bleu de gènes*, nach frz. *gènes* für die norditalienische Stadt Genua, die zu den Hauptausfuhrhäfen für Baumwolle gehörte). Auch der rote Farbstoff Indirubin, ein Isomeres von Indigo, und seine Derivate wurden zum Färben von Textilien verwendet (Farbwerke vorm. Meister Lucius & Brüning, 1913). Die Anwendung in größerem Maßstab scheiterte aber an deren geringer Farbechtheit.



Abb. 5: *Indigofera tinctoria*

In der traditionellen chinesischen Medizin spielt Indigo, mit gewissen Beimengungen anderer Stoffe, insbesondere des Indirubins, schon lange eine wichtige Rolle. Die Lage Chinas im subtropischen und gemäßigten Bereich stellte hervorragende Bedingungen zur Ausbildung einer großen Diversität unter den Pflanzenarten dar. Über 4800 Arten zeigen ein potientes therapeutisches Potential und etwa 500 sind gebräuchlich (Han, 1988). Mehrere chinesische Pflanzen enthalten Substanzen mit signifikanter Antitumorwirkung: zum Beispiel Camptothecin aus *Camptotheca acuminata* oder Harringtonin und Homoharringtonin aus *Cephalotaxus* spp. (Han, 1994). Die erste Zusammenstellung chinesischer Arzneimittel stammt aus dem Jahr 200 n. Chr. und enthält 365 Einträge, einen für jeden Tag des Jahres. Die aktuelle Chinesische Pharmakopöe (1995) enthält etwa 500 Einträge, dabei stammen die Substanzen der meisten Einträge von Pflanzen. Seit 1920 und besonders in den letzten drei Jahrzehnten sind große Anstrengungen unternommen worden, pharmakologisch aktive Substanzen aus chinesischen Arzneipflanzen zu isolieren und deren Struktur aufzuklären. Ein interessanter Aspekt sind dabei die Wirkungen des Indigoisomeren Indirubin und seiner Derivate. Chronisch myeloische Leukämie (CML) wurde in China mit *Danggui Longhui Wan* behandelt, das aus zehn pflanzlichen

Zutaten und Moschus besteht (Chinesische Pharmakopöe, 1995). Die antileukämische Wirkung konnte auf eine einzige der pflanzlichen Zutaten, den *Qingdai* oder *Indigo naturalis* zurückgeführt werden. Das blauschwarze Pulver wurde aus den Blättern der Acanthaceae *Baphicacanthus cusia*, der Polygonaceae *Polygonum tinctorium* und der Brassicaceae *Isatis indigotica* gewonnen und wird in der traditionellen chinesischen Medizin als Hämostatikum, Antipyretikum, Antiphlogistikum, Sedativum und zur Behandlung von bakteriellen und viralen Infektionen benutzt. Im weiteren konnte die antileukämische Eigenschaft einem einzigen Inhaltsstoff, dem Indirubin, zugeschrieben werden (Zhu und Woerdenbag, 1996; Tang und Eisenbrand, 1992), das im natürlichen Indigo in Mengen zwischen 0,05 und 0,3 % enthalten ist (Han, 1994; Tang und Eisenbrand, 1992). Auch in getrocknetem Pflanzenmaterial der Orchidaceae *Calanthe discolor*, mit dem in der traditionellen chinesischen Medizin Entzündungen und bakterielle Infektionen behandelt wurden, konnte Indirubin als Inhaltsstoff identifiziert werden (Yoshikawa et al., 1998). Zwar zeigt es nur eine moderate Wirksamkeit, seine im Vergleich zu anderen antileukämischen Mitteln sehr geringen Nebenwirkungen erregten aber in besonderem Maße Interesse an seinem Wirkmechanismus, der ein anderer zu sein scheint als bei allen bekannten antileukämischen Wirkstoffen. Im Zuge des allgemein zunehmenden Interesses an Naturstoffen bei der Entwicklung neuer antineoplastischer Substanzen beginnt sich daher für Indigo und insbesondere für sein Isomeres Indirubin ein gänzlich neues Anwendungsfeld abzuzeichnen.

Die klassischen Behandlungsmethoden für Krebs wie Operation und Bestrahlung können nur bei lokalisierten Tumoren, die noch nicht metastasieren, erfolgreich eingesetzt werden. Um Metastasen oder nichtlokalisierte Tumoren, wie Leukämien und Lymphome zu behandeln, greift man zu Chemotherapeutika, von denen die meisten zytostatisch wirken und einige, wie auch die Behandlung durch Bestrahlung, ein "Selbstmordprogramm" (Apoptose) der Zelle auszulösen scheinen. Die heute verfügbaren Medikamente versagen häufig, weil sie auch die gesunden Zellen töten und dadurch schwere Nebenwirkungen auslösen (zum Beispiel Haarausfall, Knochenmarkstoxizität oder Induktion von Sekundärtumoren). Es kann zur Resistenz gegen die verabreichten Medikamente kommen und häufig gleichzeitig gegen viele andere Therapeutika (*Multi-Drug-Resistance*). Die zur Zeit verwendeten antineoplastischen Therapeutika lassen sich in verschiedene Gruppen einordnen. Es gibt Stoffe, die kovalente Bindungen mit Bestandteilen der Zelle, insbesondere der DNA eingehen, zum Beispiel Cisplatin, Carboplatin, *N*-Nitrosoharnstoffderivate, Ethyleniminderivate, Busulfan sowie Schwefel- und Stickstofflostabkömmlinge, wie Cyclophosphamid, Trofosfamid oder Ifosfamid. Sogenannte Antimetabolite wie der Folsäureantagonist Methotrexat, die Purinbasenantagonisten 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin oder die Pyrimidinbasenantagonisten 5-Fluoruracil und Cytosinarabinosid blockieren die DNA-Synthese. Mitosehemmer inhibieren den Aufbau (Colchizin, Vinblastin, Vincristin, Vindesin) oder den Abbau (Taxol, Taxotère) der Mikrotubuli. Zytostatisch wirkende Antibiotika, wie Actinomycine, Anthracycline, Bleiomycin oder Mitomycine interkalieren meist in die DNA und können durch Biotransformation freie Radikale bilden. Hormone und Hormonantagonisten finden bei der Bekämpfung von Tumoren Anwendung, deren Wachstum hormonell abhängig ist. Beispiele hierfür sind

Tamoxifen als Antiestrogen und Flutamid als Antiandrogen. Hydroxyharnstoff hemmt die Ribonucleosiddiphosphat-Reduktase, wodurch der Übergang der Zellen von der G₁- zur S-Phase des Zellzyklus blockiert wird und eine Synchronisation des Tumorwachstums erreicht werden kann. Phasenspezifische Zytostatika wie zum Beispiel Colchizin können dadurch in ihrer Wirkung effektiver werden. Phasenunspezifische Wirkstoffe sind im Gegensatz dazu zum Beispiel jene Stoffe, die kovalente Bindungen mit den Bestandteilen der Zelle eingehen (Mutschler, 1996).

Ziel der aktuellen Forschung ist es unter anderem, Chemotherapeutika zu entwickeln, die gesunde Zellen möglichst wenig beeinflussen. Ein Ansatz ist das sogenannte Prodrug-Konzept, bei dem die Stoffe selbst nicht zytotoxisch sind, sondern erst im Tumor selbst durch tumorspezifische, enzymatische oder chemische Prozesse in die aktive Form überführt werden. Beispielsweise exprimieren Tumorzellen verstärkt Plasminaktivatoren, die bewirken, daß an Tumoren eine erhöhte Konzentration der Serin-Protease Plasmin vorliegt. Ein Plasmin-Substrat (zum Beispiel ein Oligopeptid), das mit einem zytotoxischen Rest konjugiert ist, der erst durch die Umsetzung des Substrats freigesetzt wird, sollte somit bewirken, daß die toxischen Effekte dieses Restes verstärkt in Krebszellen auftreten (Lauck-Birkel et al., 1994). Andere häufig auftretende tumorspezifische Besonderheiten sind zum Beispiel niedriger Sauerstoffgehalt (Hypoxie) oder die fehlerhafte Ausbildung (Fenestrierung) von Blutgefäßen in Tumoren. Sauerstoffmangel inspirierte die Entwicklung reduktiv aktivierbarer Prodrugs (Springer, 1998). Die erhöhte Durchlässigkeit der Tumorgefäße für große Moleküle führte zu der Entwicklung von an Makromolekülen gebundenen antineoplastischen Wirkstoffen (Springer, 1998; Schneider, 1999). Parallel zu diesem Forschungsansatz wird zur Entwicklung neuer Tumorthapeutika in den letzten Jahren verstärkt der mit einer sehr großen Vielfalt an Strukturen ausgestattete Substanzpool der Naturstoffe herangezogen. Ein Großteil der in den Industrieländern eingesetzten Arzneimittel ist pflanzlicher Herkunft oder nach dem Vorbild von Naturstoffen hergestellt. Die Ende der 60er Jahre aus dem Madagaskar-Immergrün (*Catharanthus roseus*) gewonnenen Substanzen Vincristin und Vinblastin und in gewissem Maß das aus Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*) gewonnene Colchizin waren allerdings für zwei Jahrzehnte die einzigen wichtigen Entdeckungen im Hinblick auf antineoplastische Wirkstoffe (Lozoya, 1997). In neuerer Zeit wurden mehr interessante Entdeckungen im Bereich der Naturstoffe gemacht. Taxol aus der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*), das gegen Brust- und Eierstockkrebs eingesetzt wird (Nicolaou et al., 1996) oder bestimmte Stoffwechselprodukte von Myxobakterien (*Sorangium cellulosum*), die Epothilone, die einen ähnlichen Wirkmechanismus wie Taxol haben, dabei aber wesentlich polarer sind und deshalb der *Multi-Drug-Resistance* besser widerstehen können (Schinzer und Limberg, 1997) sind zwei Beispiele. Im Rahmen dieser Arbeit ist die Entdeckung des Indirubins als das antileukämische Prinzip des chinesischen *Indigo naturalis* von besonderer Bedeutung.

Im Laufe der letzten zehn Jahre wurde immer deutlicher, daß in und zwischen Zellen ein kompliziertes Signalnetzwerk existiert. Insbesondere proliferationsregulierende Signale innerhalb von Zellen werden

dabei über Proteinkinasekaskaden weitergeleitet. In Krebszellen sind Onkogene aktiviert und Tumorsuppressorgene inaktiviert worden. Dadurch ist offenbar dieses komplexe Signalnetzwerk, mit dem die Zelle normalerweise ihr Wachstum und ihre Vermehrung steuert, in starkem Maße modifiziert. Das Augenmerk mechanismusorientierter Forschungsansätze in der Entwicklung neuer antineoplastischer Wirkstoffe richtet sich daher auf die Beeinflussung der außer Kontrolle geratenen Signalübertragung auf der Ebene der Proteinkinasen. Das geschieht in der Hoffnung, auf diese Weise das Krebswachstum bremsen oder rückgängig machen zu können, ohne die Nebenwirkungen zu erzeugen, wie sie bei den herkömmlichen Wirkstoffen häufig auftreten (Fabbro, 1996). So wird bei einigen antineoplastischen Wirkstoffen die Hemmung von Serin-/Threoninkinasen wie der Proteinkinase C (PKC) oder von Tyrosinkinasen wie der EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase zumindest als Teil ihres Wirkmechanismus diskutiert (Powis, 1991). Ein neuer, vielversprechender Forschungsansatz greift in das Räderwerk der Zellzykluskontrolle ein und versucht die Rolle der cyclinabhängigen Kinasen (CDK) auszunutzen. Da in stark proliferierenden Zellpopulationen auch die Zellzyklusmaschinerie hochaktiv ist, müßten Stoffe, die spezifisch Elemente dieser Maschinerie hemmen oder blockieren, geeignet sein, das Krebswachstum zu bremsen. Ihre anscheinend auf das Vorantreiben des Zellzyklus begrenzte Rolle sollte die Wahrscheinlichkeit reduzieren, daß spezifische Inhibitoren Ereignisse beeinflussen, die nicht mit dem Zellzyklus in Verbindung stehen, und sollten deshalb nichtproliferierende Zellen unbehelligt lassen. Einige Naturstoffe wie zum Beispiel Flavopiridol (**59a**) oder von Naturstoffen abgeleitete Substanzen, wie Roscovitin (**53**) zeigen eine bemerkenswerte Selektivität für diese Enzyme (Meijer, 1995).

2 Grundlagen

2.1 Indirubin und seine Isomeren

Die Bezeichnung Indirubin tauchte erstmals 1855 auf. Isatan B, damals als Indican bezeichnet, wurde aus den Blättern des Färberwaides isoliert und daraus Indigo und Indirubin gewonnen. "Letztere Substanz..." (Indirubin) "...bildet sich stets bei der Zersetzung des Indicans durch Säuren, aber erst nach der Entstehung des Indigblaus und namentlich nach längerem Kochen der sauren Flüssigkeit, in welcher Indigblau aus Indican entstanden war" (Schunk, 1855).

2.1.1 Synthesen von Indirubin (11)

Indirubin entstand zunächst nur als Nebenprodukt bei Versuchen, Indigo zu synthetisieren. Baeyer und Emmerling (1870) erhielten Indirubin in veränderlichen Anteilen neben Indigo, indem sie Isatin, Phosphortrichlorid und Essigsäurechlorid im zugeschmolzenen Glasrohr zusammen mit Phosphor erhitzen und anschließend wässrig aufarbeiteten. So wurde auch aus der Reaktion von 2-Chlor-3*H*-indol-3-on (**14**) mit Ammoniumsulfid oder weißem Phosphor und anschließender wässriger Aufarbeitung (Baeyer, 1878 c) oder mit Zinkstaub in Eisessig (Baeyer, 1879) Indirubin als Nebenprodukt erhalten.

Erstmals gezielt wurde Indirubin von Baeyer aus einer ethanolischen Indoxyllösung, Isatin und Natriumcarbonat im Jahre 1881 synthetisiert (Baeyer, 1881).

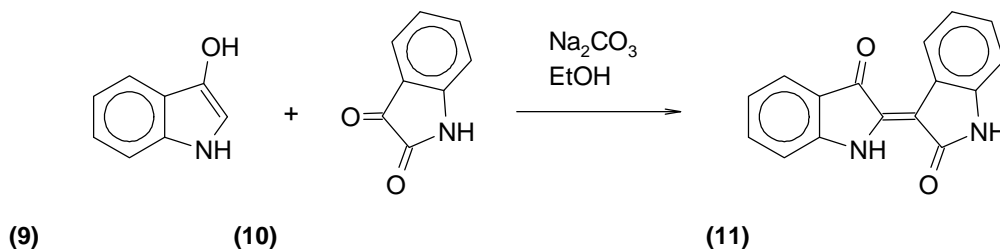
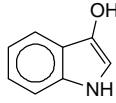
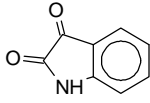
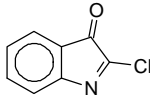
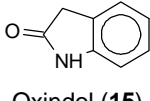
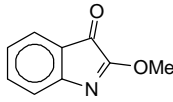
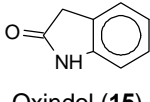
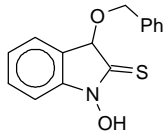
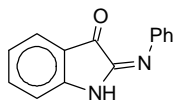
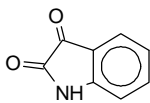
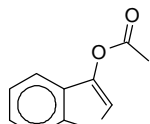
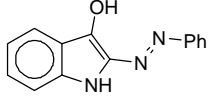
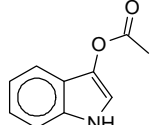
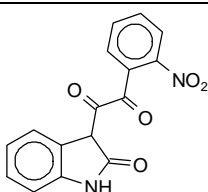
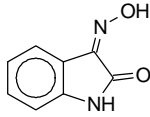
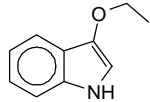
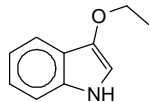
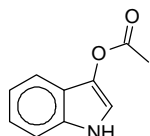
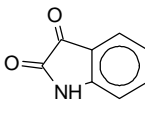


Abb. 6: Indirubinsynthese, ausgehend von Indoxyl (**9**) und Isatin (**10**) (Baeyer, 1881)

Die zahlreichen weiteren Synthesen, die im Laufe der Zeit entwickelt wurden, sind in **Tab. 1** aufgelistet.

Tab. 1: Indirubinsynthesen

| Edukte | Bedingungen | Literatur |
|--|--|---|
|  <p>Indoxyl (9)</p> |  <p>Isatin (9)</p> | EtOH, Na ₂ CO ₃ Baeyer, 1881 |
|  <p>2-Chlor-3H-indol-3-on (14)</p> |  <p>Oxindol (15)</p> | Pyridin, wasserfrei Toluol, wasserfrei Wahl und Bagard, 1910 Katritzky et al., 1989 |
|  <p>2-Methoxy-3H-Indol-3-on (16)</p> |  <p>Oxindol (15)</p> | Benzol, Ac ₂ O, H ₂ SO ₄ , wasserfrei Wahl und Bagard, 1913 a |
|  <p>1-Hydroxy-3-benzoyloxy-2,3-dihydroindol-2-thion (17)</p> | - | H ₂ O, Na ₂ S, NaHCO ₃ Albert, 1915 |
|  <p>2-Phenyliminoisatin (18)</p> |  <p>Isatin (9)</p> | H ₂ S NH ₄ OH Martinet, 1919 |
|  <p>Indoxylacetat (19)</p> | - | H ₂ O ₂ (30 %) Vorländer et al., 1919 |
|  <p>2-Phenylazoindoxyl (20)</p> | - | Na ₂ S ₂ O ₄ wäßrig alkalisch Martinet und Dornier, 1920 |
|  <p>Indoxylacetat (19)</p> | - | FeCl ₃ salzsaure Lösung Spencer, 1931 |
|  <p>(2-Nitrophenyl)-(2-oxo-2,3-dihydroindol-3-yl)-ethandion (21)</p> | - | EtOH, Zn, HOAc oder EtOH, NH ₄ OH, H ₂ S Ainley und Robinson, 1934 |

| | | | |
|--|--|---------------------------------------|---|
|  Isatin-3-oxim (22) | - | LiAlH ₄ | Giovannini et al., 1957 b |
|  2-Ethoxyindol (23) | - | O ₂ | Plieninger et al., 1965; Plieninger und Wild, 1966 |
|  2-Ethoxyindol (23) | - | Benzol, PbO ₂ | Bauer, 1967 |
|  Indoxylacetat (19) |  Isatin (9) | MeOH, Na ₂ CO ₃ | Russell und Kaupp, 1969 |

Auch mit biotechnologischen Methoden kann Indirubin erzeugt werden. Aus Kulturen rekombinanter *Escherichia coli*-Stämme, transfiziert mit dem Gen einer Naphthalindioxygenase (Ensley et al., 1982; Ensley et al., 1983; Weyler et al., 1997) oder einer Phenolmonooxygenase (Kim und Oriol, 1998) kann bei geeigneter Einstellung der Kulturbedingungen Indirubin gewonnen werden (siehe dazu auch Kapitel 2.1.3.1).

2.1.2 Synthesen von Derivaten des Indirubins

An den Benzolkernen substituierte Indirubinderivate werden meist aus den entsprechend substituierten Vorläufermolekülen synthetisiert. So kann zum Beispiel Isatin mit Chlorid iodiert werden (Borsche, 1924, Roedig, 1960) und das entstandene 5-Iodisatin mit Indoxyl unter sauren Bedingungen zu 5-Iodindirubin (**90**) umgesetzt werden (Gu et al., 1989). Bromierung von Isatin zu 5-Bromisatin (**30**) oder 5,7-Dibromisatin bzw. Chlorierung zu 5-Chlorisatin (**32**) und Umsetzung mit 3-Hydroxyindol im sauren Medium führen zu den entsprechenden in 5-Position substituierten Indirubinderivaten. Auch eine direkte Bromierung am Indirubinsystem, zum Beispiel zu Di- und Tribromindirubin (Gu et al., 1989) ist möglich. Durch Kondensation verschiedener Derivate des Indoxylacetats (**19**) mit verschiedenen Derivaten des Isatins nach der Methode von Russell und Kaupp (1969) sind sehr viele Substitutionsmuster zugänglich. Derivate des Indoxylacetats lassen sich zum Beispiel über einen Ringschluß an Derivaten der Phenylglycin-*o*-carbonsäure darstellen. Derivate des Isatins können nach einer 1919 von Sandmeyer etablierten Methode durch Cyclisierung der korrespondierenden Isonitrosoacetanilide mit konzentrierter Schwefelsäure dargestellt werden (Holt und Sadler, 1958). In **Abb. 7** sind die Reaktionen dargestellt.

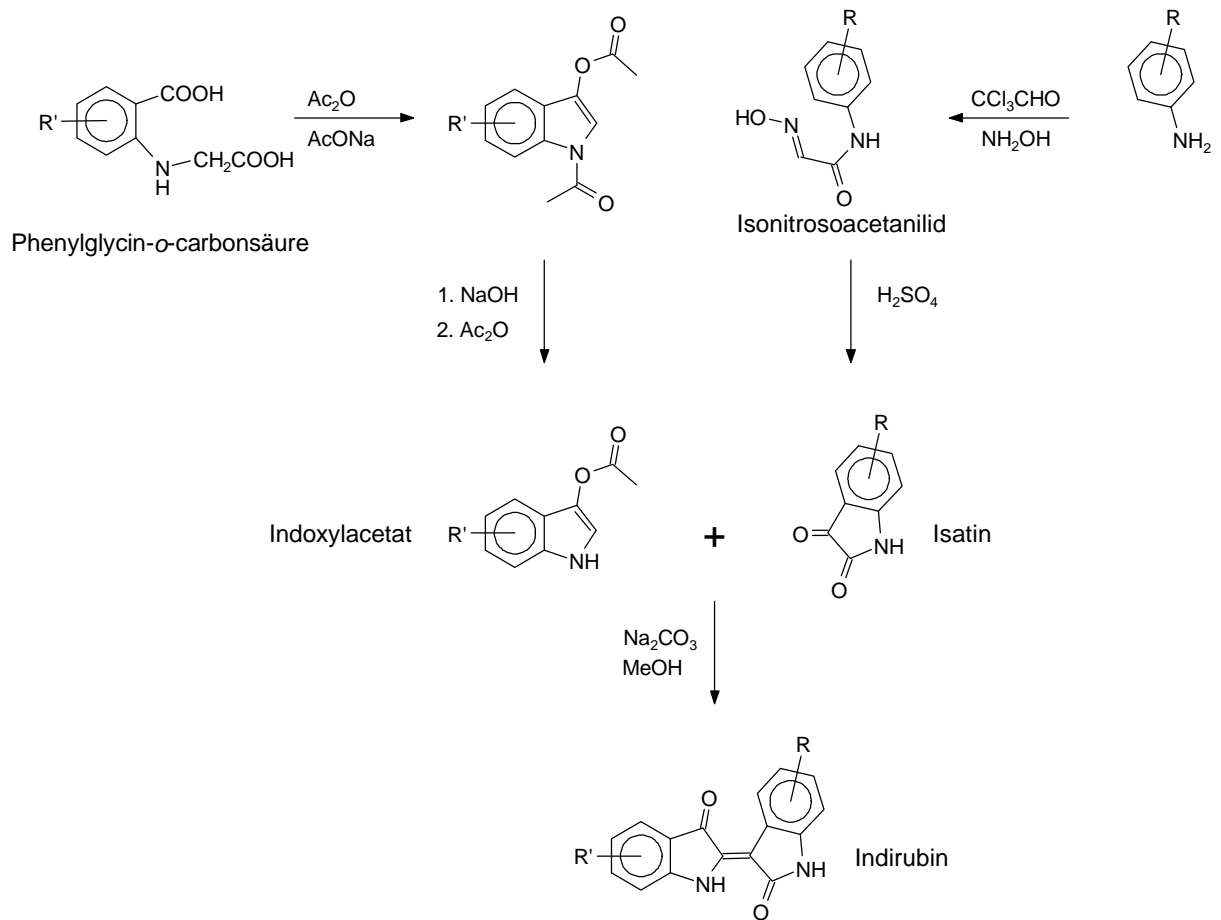
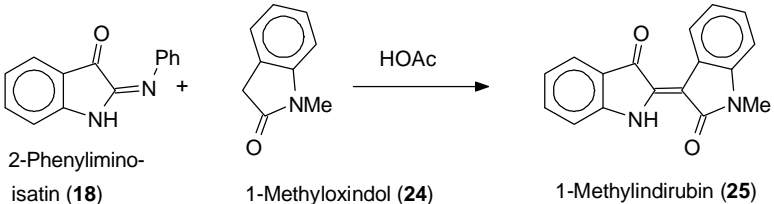
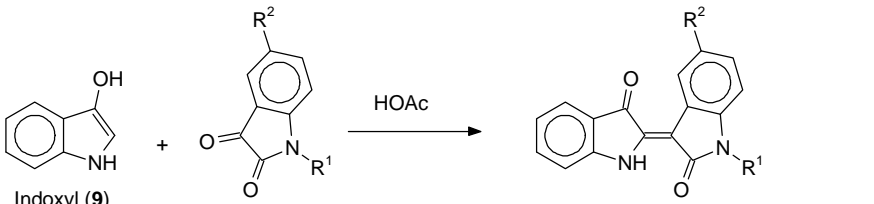
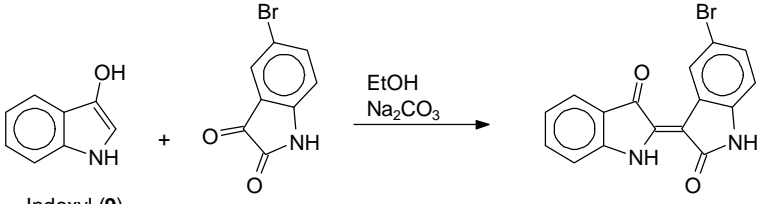
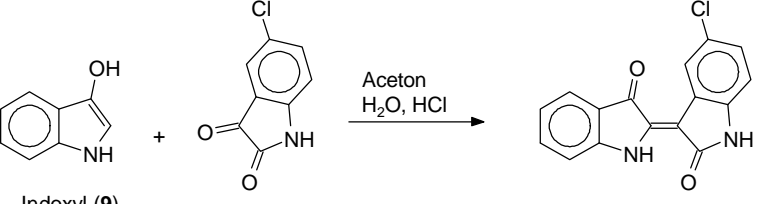
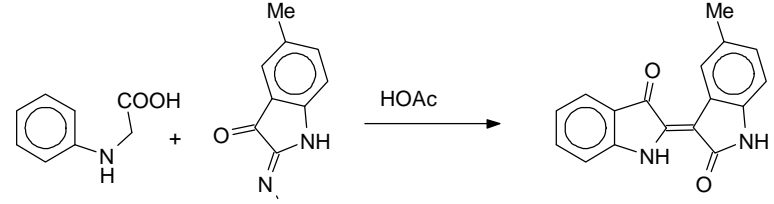


Abb. 7: Durch Synthese entsprechender Derivate des Indoxylacetats (**19**) und des Isatins (**10**) ist eine große Vielfalt an substituierten Indirubinderivaten zugänglich (Holt und Sadler, 1958).

In **Tab. 2** sind Synthesen ausgewählter Indirubinderivate zusammengestellt, die nach obigem oder einem anderen Prinzip dargestellt wurden.

Tab. 2: Synthesen von in 1- oder 5-Stellung substituierten Indirubinderivaten

| Syntheschema | Literatur |
|--|--|
| <p>1-Methylindirubin (25)</p>  <p>2-Phenyliminoisatin (18) + 1-Methoxyindol (24) $\xrightarrow{\text{HOAc}}$ 1-Methylindirubin (25)</p> | <p>Porter et al., 1941</p> <p>andere Synthese: Martinet, 1919</p> |
| <p>1-Phenylindirubin (28), Indirubin-5-sulfonsäure (Kaliumsalz) (29a)</p>  <p>Indoxyl (9) + 1-Phenylisatin ($R^1 = \text{Ph}, R^2 = \text{H}$) (26) $\xrightarrow{\text{HOAc}}$ 1-Phenylindirubin ($R^1 = \text{Ph}, R^2 = \text{H}$) (28)</p> <p>Indoxyl (9) + Isatin-5-sulfonsäure ($R^1 = \text{H}, R^2 = \text{SO}_3\text{K}$) (Kaliumsalz) (27a) $\xrightarrow{\text{HOAc}}$ Indirubin-5-sulfonsäure ($R^1 = \text{H}, R^2 = \text{SO}_3\text{K}$) (Kaliumsalz) (29a)</p> | <p>28: Friedländer und Kunz, 1922</p> <p>29a: Martinet und Dornier, 1921</p> |
| <p>5-Bromindirubin (31)</p>  <p>Indoxyl (9) + 5-Bromisatin (30) $\xrightarrow{\text{EtOH, Na}_2\text{CO}_3}$ 5-Bromindirubin (31)</p> | <p>Baeyer, 1881</p> |
| <p>5-Chlorindirubin (33)</p>  <p>Indoxyl (9) + 5-Chlorisatin (32) $\xrightarrow{\text{Aceton, H}_2\text{O, HCl}}$ 5-Chlorindirubin (33)</p> | <p>Gu et al., 1989</p> |
| <p>5-Methylindirubin (36)</p>  <p>N-Phenylglycin (34) + 5-Methyl-2-phenylimino-2,3-dihydroindol-3-on (35) $\xrightarrow{\text{HOAc}}$ 5-Methylindirubin (36)</p> | <p>Martinet, 1919</p> <p>andere Synthese: Wahl und Faivret, 1926 (analog Baeyer, 1881; vgl. Abb. 6)</p> |

Indirubin-3'-oxim (**87**) findet das erste Mal in einer Patentschrift der späteren Hoechst AG Erwähnung. Die Synthese wird in Pyridin mit Hydroxylamin durchgeführt. Das Natriumsalz der 3'-Hydroxyiminoindirubin-5-sulfonsäure wird in wässriger Lösung aus dem Natriumsalz der Indirubin-

5-sulfonsäure (**29b**) und Hydroxylamin in alkalischer Lösung dargestellt (Farbwerke vorm. Meister Lucius & Brüning, 1913). Li et al. (1996) synthetisieren Indirubin-3'-oxim aus Indirubin und Hydroxylamin in ethanolischer Kaliumhydroxidlösung.

2.1.3 Synthesen von Indigo und Isoindigo

Bei der Betrachtung der biologischen (insbesondere der wachstumshemmenden und antineoplastischen) Eigenschaften von indigoiden Stoffen spielen auch Indigo und Isoindigo sowie deren Derivate eine Rolle, deswegen wird im folgenden auf die Synthese dieser Stoffklassen eingegangen.

2.1.3.1 Indigo (12)

Die Indigosynthesen unterscheiden sich von den Indirubinsynthesen dadurch, daß stets von einem einzigen Edukt ausgegangen werden konnte, um das symmetrische Indigomolekül zu gewinnen. Bei einigen Synthesen des Indirubins mußten dagegen zwei Edukte zur Gewinnung des unsymmetrischen Indirubinmoleküls herangezogen werden. Die außerordentliche wirtschaftliche Bedeutung des Farbstoffs Indigo vor Beginn und am Anfang des 20. Jahrhunderts führte zur Entwicklung einer Fülle an Synthesen, wobei die ersten, wie weiter oben erwähnt (Kapitel 2.1.1) neben Indigo in wechselnden Anteilen auch Indirubin lieferten (Baeyer und Emmerling, 1870; Baeyer, 1878 c; Baeyer, 1879). In sehr geringen Ausbeuten synthetisierten 1870 Emmerling und Engler Indigo aus 2-Acetyl-1-nitrobenzol mit Zinkstaub unter alkalischen Bedingungen (Emmerling und Engler, 1870). Die erste Total-synthese des Indigo entwickelte Baeyer 1878 (**Abb. 8**).

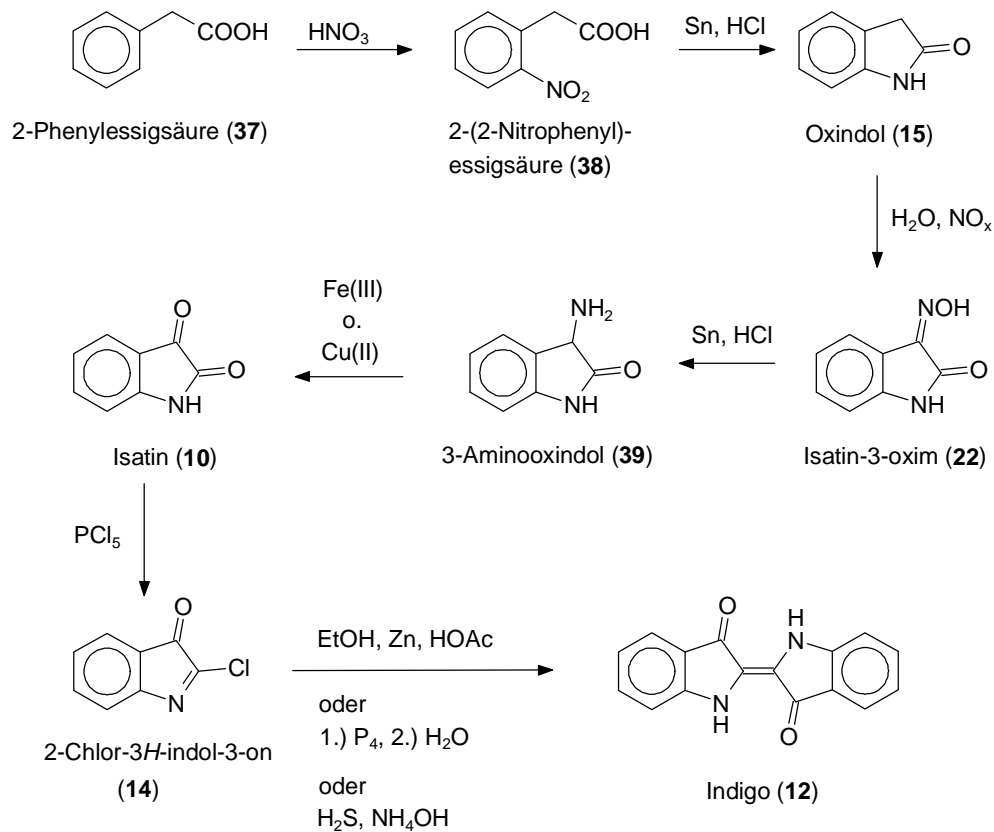


Abb. 8: Baeyersche Totalsynthese von Indigo (12), ausgehend von 2-Phenylessigsäure (37). (Baeyer und Knop, 1866; Baeyer, 1878 a-c)

Ein wesentlich preisgünstigerer Syntheseweg, ausgehend von dem aus Steinkohlenteer gewonnenen Anilin, wurde von Heumann (1890 a und b) entwickelt und von Pflieger verbessert (Pflieger, 1901). Das von Chloressigsäure und Anilin oder Anthranilsäure ausgehende Verfahren wurde 1925 auf die neuen Ausgangsmaterialien Anilin, Formaldehyd und Blausäure (BASF, 1899; BASF, 1900) umgestellt. Im Prinzip wird noch heute auf die gleiche Art und Weise Indigo synthetisiert (Schmidt, 1997).

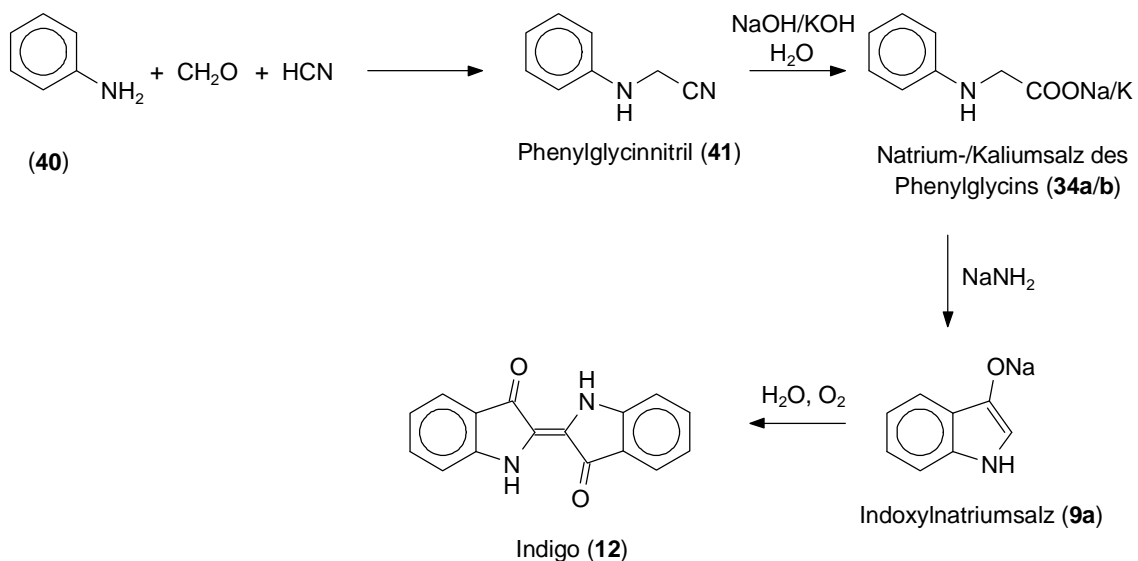


Abb. 9: Synthese von Indigo (12) nach Heumann und Pflieger (Heumann, 1890 a und b; BASF, 1899; BASF, 1900; Pflieger, 1901).

In der Folgezeit wurden zahlreiche weitere Indigosynthesen entwickelt, unter anderem von Baeyer selbst, von denen jedoch keine die Wirtschaftlichkeit des Heumann/Pfleger-Verfahrens verbessern konnte. Indigo wurde aus 2-Chlor-3*H*-indol-3-on und Iodwasserstoff oder Zink in Eisessig dargestellt (Baeyer, 1879). Aus 3-(2-Nitrophenyl)propionsäure wurde durch Reduktion mit Milchzucker unter alkalischen Bedingungen (Baeyer, 1880), durch Erhitzen von 2,3-Epoxy-3-(2-nitrophenyl)propionsäure (Baeyer, 1880) oder Indoxylsulfat (**4**) (Baumann und Tiemann, 1879) Indigo hergestellt. Des Weiteren wurde Indigo aus 3-Hydroxyindol-2-carbonsäure und (2-Nitrophenyl)propionsäure unter der Einwirkung von Natriumcarbonat (Baeyer, 1881), aus 4-(2-Nitrophenyl)-oxetan-2-on in Essigsäure (Einhorn, 1883) oder durch Verschmelzen von KOH mit Bromessigsäureanilid und anschließendem Aufarbeiten im Wäßrigen unter Einwirkung von Luft (Flimm, 1890) synthetisiert. Indigo konnte auch aus 2-(2,2-Dichloracetyl)-1-nitrobenzol, 2-(2,2-Dibromacetyl)-1-nitrobenzol oder 2-(2-Bromacetyl)-1-nitrobenzol in einer ethanolischen Ammonium-sulfidlösung (Gevekoht, 1883) und aus 1,4-Diphenylpiperazin-2,5-dion mit trockenem Kaliumhydroxid und anschließender Aufarbeitung im Wäßrigen unter Einwirkung von Luftsauerstoff (Kuhara und Chikashige, 1900) gewonnen werden. 2-Thioisatin, das aus 2-Phenyliminoisatin (**18**) durch Umsetzung mit Schwefelwasserstoff in saurer Lösung zugänglich ist wurde in schwach alkalischer, wäßriger Lösung zu Indigo umgesetzt (Sandmeyer, 1903). Die Einwirkung von Peroxybenzoesäure auf Indol (**43**) liefert ebenfalls Indigo (Witkop und Fiedler, 1947). Auch in jüngerer Vergangenheit wurden Indigosynthesen entwickelt. So entsteht aus der Umsetzung von 2-(Tosylamino)benzoylchlorid mit Diazomethan *o*-Tosylamino-*w*-diazacetophenon, und dieses cyclisiert unter Stickstoffabspaltung zu *N*-Tosylindoxyl, das dann in alkalischer Lösung unter Luftzutritt zu Indigo dimerisiert (Hampel, 1969). Ausgehend von Isatin kann mit Tetraphosphordekasulfid als Reduktionsmittel Indigo gewonnen werden (Bergman und Staelhandske, 1994).

Auch mit biotechnologischen Methoden wurden Indigosynthesen realisiert. So können einige Bakterienarten, die aromatische Kohlenwasserstoffe zu *cis*-Dihydrodiolen oxidieren, auch aus Tryptophan oder Indol Indigo bilden. In einem rekombinanten *Escherichia coli*-Stamm wird ein Schritt der Reaktionsfolge zu Indigo durch Naphthalindioxygenase katalysiert (Ensley et al., 1982; Ensley et al., 1983).

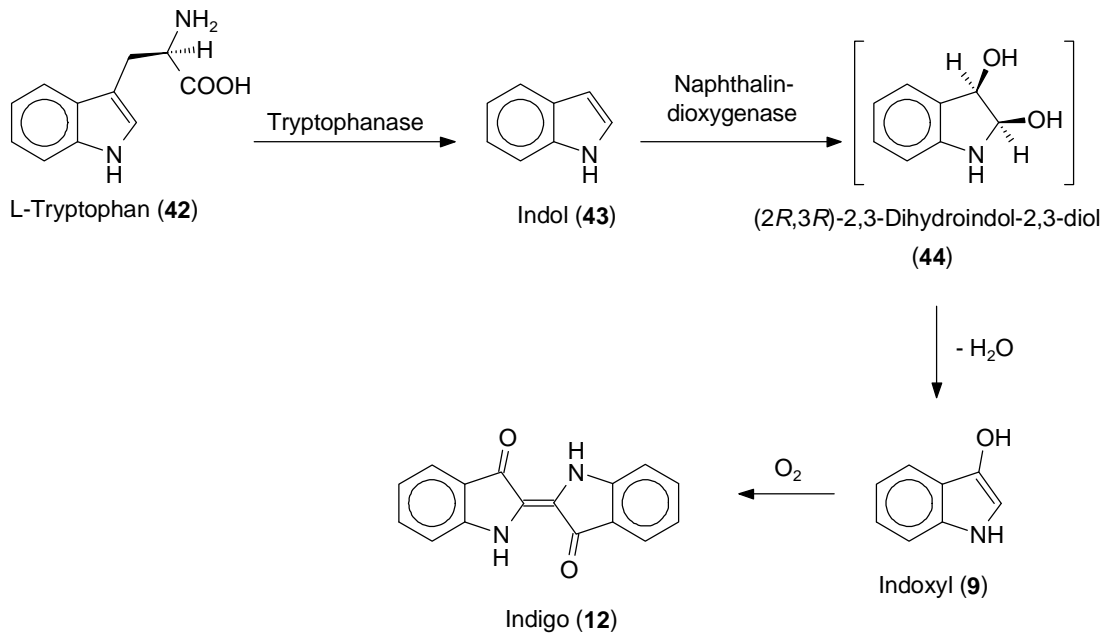


Abb. 10: Von Ensley et al. (1983) vorgeschlagener Reaktionsweg für die Biosynthese von Indigo (12) in einem rekombinanten *Escherichia coli*-Stamm. Indol (43) wird von der natürlicherweise in *E. coli* vorkommenden Tryptophanase aus Tryptophan hergestellt. Die Naphthalindioxygenase entsteht durch Expression klonierter *Pseudomonas*-DNA und oxidiert Indol (43) zu 2,3-Dihydroindol-2,3-diol, das unter spontaner Wasserabspaltung und Oxidation/Dimerisation zu Indigo (12) weiterreagiert. (Ensley et al., 1983)

Unsubstituierter (*Z*)-Indigo (*cis*-Indigo, *Indigotin*) ist bei Raumtemperatur nicht stabil und wandelt sich in (*E*)-Indigo um. Substituierte Verbindungen, in denen das Indigosystem in eine (*Z*)-Konfiguration gezwungen wird, wie zum Beispiel *N,N'*-Oxalyindigo sind aber isolierbar und stabil (Wyman und Zenhäusern, 1965).

2.1.3.2 Isoindigo (13)

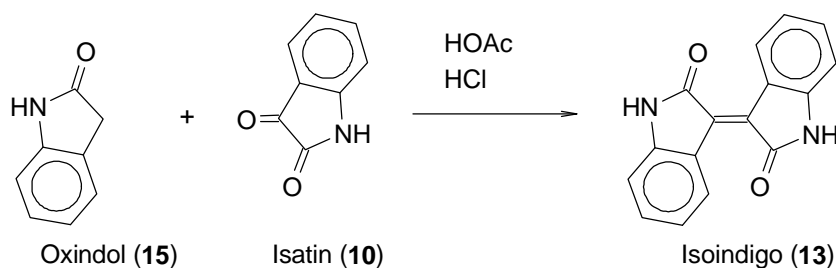


Abb. 11: Synthese von Isoindigo (13) (Wahl und Bagard, 1909 a und b)

Auch für das dritte Konstitutionsisomere, Isoindigo, wurden zahlreiche Synthesen entwickelt. *Beilsteins Handbuch der Organischen Chemie* gibt bereits für das Jahr 1841 Darstellungsmöglichkeiten für Isoindigo an (Laurent, 1841). Eine Möglichkeit geht dabei von 3-Hydroxy-3,3'-bis(2,3-dihydroindol)-2,2'-dion aus, das durch Einwirken von Kaliumnitrosodisulfonat (*Fremys Salz*) auf eine Lösung von Oxindol (15) in Methanol/Wasser zugänglich ist und sich durch Wasserabspaltung in Isoindigo überführen lässt (Teuber und Hohn, 1982). Isoindigo lässt sich außerdem direkt aus Oxindol (15) und Isatin (Wahl und Bagard, 1909 a und b; Papageorgiou und Borer, 1988), aus 2-Methoxy-2,3-

dihydroindol-3-on (Wahl und Bagard, 1913 a) oder aus dem Oxindolderivat 7,7-Diphenyl-2-aza-6-oxa-benzo[c]spiro[4.2]-3-hexenon (Schönberg und Junghans, 1963), jeweils in einem Essigsäure/Salzsäuregemisch, darstellen. Weitere Isoindigosynthesen nutzen die Reaktion von Isatin mit Natriumsulfid in ammoniakalischer Lösung (Friedländer und Sander, 1924), von Oxindol mit Dischwefeldichlorid in Xylol (Chovin, 1944), von 2-Chlor-3*H*-indol-3-on mit Iod (Bauer, 1967) oder von Isatin mit Triphenylphosphan in Toluol (Lathourakis und Litinas, 1996). Ausgehend von 3,3'-Azinoisatin gelangt man durch Erhitzen zu Isoindigo (Buu-Hoi und Saint-Ruf, 1968). Aus 3-Diazoindol läßt sich in benzolischer Lösung bei 200 °C unter hohem Druck (Staudinger und Goldstein, 1916) oder in geringen Ausbeuten durch Belichten (Voigt und Meier, 1975) Isoindigo darstellen.

2.1.4 Biologische Aktivität von Derivaten des Indirubins und seiner Isomeren

2.1.4.1 Wirksamkeit gegen Tumoren

Indirubin hemmt *in vivo* das Lewis-Lungenkarzinom (LLK) in Mäusen und das Walker-Karzinom W256 in Ratten aber nicht die Leukämiezelllinien L7212 und P388 in Mäusen (Ji et al., 1981). Halogensubstituierte Indirubinderivate zeigen im Vergleich zu Indirubin eine gesteigerte *in vivo*-Antitumoraktivität. 5-Iodindirubin bewirkt eine Erhöhung der Lebensdauer von Mäusen mit L7212 um 41 - 73 % (Indirubin: 0 %) (Gu et al., 1989) und von Ratten mit W256 um 48 - 83 % (Indirubin: 30 %) (Gu et al., 1989; Du et al., 1991). Diese und weitere Ergebnisse zur Aktivität von Derivaten des Indirubins an den Zelllinien L7212, W256 und am Lewis-Lungenkarzinom sind in **Tab. 3** aufgelistet.

Tab. 3: zytotoxische und antineoplastische Wirkung von Derivaten des Indirubins (**11**), Indigos (**12**) und Isoindigos (**13**) an W256 (Walker Karzinom, *in vivo* in Ratten), L7212 (Leukämie, *in vivo* in Mäusen) und LLK (Lewis-Lungenkarzinom, *in vivo* in Mäusen)

| | Substanz | W256 <i>in vitro</i> | W256 <i>in vivo</i> | L7212 ¹⁾ <i>in vivo</i> | LLK <i>in vivo</i> |
|---------------------------|--|-------------------------|------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| Indirubinderivate | 1-Methylindirubin (25) | -- [1] | + [2] | | |
| | 1'-Methylindirubin | - [1] | - [2] | | |
| | 1,1'-Dimethylindirubin | + [1] [5] ²⁾ | | ²⁾ | |
| | 1-Ethylindirubin | -- [1] | ++ [2] [3] [4] ³⁾ | | ++ [4] |
| | 1'-Ethylindirubin | + [1] | -- [2] | | |
| | 1-Propylindirubin | + [1] | ++ [3]; [2] | | |
| | 1-Butylindirubin | | + [2] | | |
| | 1-Alkylindirubin Alkyl = C ₅ H ₁₁ – C ₁₈ H ₃₇ | | - [2] | | |
| | Indirubin-1-carbonsäure | | ++ [3] | | |
| | Indirubin-1-carbonsäure-ethylester | | + [2] | | |
| | 1-Carboxymethylindirubin | | + [2] | | |
| | 1-Formylindirubin | | - [2] | | |
| | 1-Acetylindirubin | + [5] | ++ [3] | | |
| | 1-(2,3-Epoxy-1-propyl)indirubin | | -- [2] | | |
| | 5-Bromindirubin (31) | | ++ [6] | ++ [6] | |
| | 5-Chlorindirubin (33) | | ++ [6] | ++ [6] | |
| | 5-Iodindirubin (90) | | ++ [6] [7] | ++ [6] | |
| | 5,7-Dibromindirubin | | | -- [6] | |
| Indirubin-3'-oximderivate | Indirubin-3'-oxim (87) | | | -- [8] | |
| | Indirubin-3'-oxim-methylether (104) | | | ++ [8] | |
| | Indirubin-3'-oxim-ethylether (105) | | | -- [8] | |
| | 1-Methylindirubin-3'-oxim | + [5] ²⁾ | | ²⁾ | |
| | 1-Methylindirubin-3'-oxim-methylether (106) | + [5] ²⁾ | | -- [8] ²⁾ | |
| | 1'-Methylindirubin | | - [2] | | |
| Indigo-derivate | Indigo (12) | -- [1] | -- [2] | | |
| | 1-Methylindigo | + [1] | ++ [2] | | |
| | 1-Ethylindigo | + [1] | + [2] | | |
| | 1-Propylindigo | -- [1] | - [2] | | |
| Isoindigo-derivate | Isoindigo (13) | -- [1] | -- [2] | | |
| | 1-Methylisoindigo | ++ [1] | ++ [2] | | |
| | 1,1'-Dimethylisoindigo | | -- [2] | | |
| | 1-Ethylisoindigo | + [1] | + [2] | | |
| | 1-Propylisoindigo | -- [1] | - [2] | | |

++: wirksamer als Indirubin, +: genauso wirksam wie Indirubin, -: wirksam, aber weniger stark als Indirubin, --: unwirksam

¹⁾ Indirubin (**11**) ist an L7212 inaktiv

²⁾ 1,1'-Dimethylindirubin, 1-Methylindirubin-3'-oxim und 1-Methylindirubin-3'-oxim-methylether (**106**) hemmen nach Zeng et al. (1982) an den Zelllinien L7212 und W256 das Wachstum stärker als Indirubin. Aus dem Abstract geht allerdings nicht hervor, ob die Versuche *in vitro* oder *in vivo* durchgeführt wurden. Der vollständige chinesische Artikel konnte nicht beschafft werden.

³⁾ Walker Karzinom W258

Literatur: [1] Wu et al., 1985 b; [2] Ji und Zhang, 1985; [3] Wu et al.; 1984; [4] Li und Ji, 1984; [5] Zeng et al., 1982²⁾; [6] Gu et al., 1989; [7] Du et al., 1991; [8] Li et al., 1996

Indirubin-3'-oxim, Indirubin-3'-oxim-methylether (**104**) und Indirubin-3'-oxim-ethylether (**105**) (Li et al., 1996; Tian et al., 1995) zeigen neben den in **Tab. 3** aufgeführten antineoplastischen Wirkungen auch eine genauso starke oder stärkere *in vitro*-Hemmwirkung als Indirubin auf verschiedene Leukämiezelllinien aus Patienten mit akuter lymphatischer, akuter myeloischer (Li et al., 1996) und chronisch granulozytärer Leukämie (Li et al., 1996, Tian et al., 1995) sowie akuter granulozytärer Leukämie (Tian et al., 1995). Dagegen zeigt 1-Methylindirubin-3'-oxim-methylether (**106**) an diesen Zellen keine Wachstumshemmung (Li et al., 1996; Tian et al., 1995).

Allerdings gibt es auch Leukämiezelllinien, die auf Substanzen, die L7121 oder W256 in ihrem Wachstum hemmen, nicht reagieren. So sind zum Beispiel 1-Methylindirubin-3'-oxim, 1-Acetylindirubin, 1-Methylindirubin-3'-oxim-methylether und 1,1'-Dimethylindirubin inaktiv gegen die Mäuse-Retikulozytenleukämie L615 und die lymphatische Leukämie L7712 (Zeng et al., 1982).

Indirubin und 5-Iodindirubin haben *in vitro* wachstumshemmende Wirkung auf weitere humane Leukämiezelllinien (akut myeloische Leukämie, HL60 und chronisch myeloische Leukämie, K562) ($IC_{50} = 3 - 6 \mu M$) und auf die humane Mammakarzinomzelllinie MCF 7 ($IC_{50} = 4 - 5 \mu M$). Indirubin, 5-Iodindirubin und Indigo haben außerdem wachstumshemmende Wirkung auf das großzellige humane Lungenkarzinom LXFL 529L ($IC_{50} = 6 - 10 \mu M$). Isoindigo bewirkt bei dieser Zelllinie keine Wachstumshemmung (Niederberger, 1998).

In einer klinischen Studien mit Indirubin in China an 314 Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) wurde in etwa einem Viertel der Fälle von einer kompletten Remission des Tumors berichtet. In etwa einem Drittel der Fälle gab es eine teilweise Remission oder zumindest eine Besserung des Zustandes. Die Toxizität war gering (Indirubin Cooperative Group, 1980; Chang, 1985; Tang und Eisenbrand, 1992; Han, 1994).

In einer klinischen Studie mit 1-Methylisoindigo an Patienten mit CML bildete sich das Krankheitsbild in einem Drittel der Fälle völlig zurück, in der Hälfte der Fälle teilweise. Die Toxizität war geringer als bei den Studien mit Indirubin (Han, 1994).

2.1.4.2 Subakute Toxizität, Resorption

Untersuchungen an Ratten zeigten bei täglicher Gabe von 100 - 400 mg/kg Indirubin nach 30 Tagen keinen Effekt auf Leukozyten, Leber oder Niere. Bei einer Tagesdosis von 80 mg/kg zeigten sich nach ein bis drei Monaten verringerte Futteraufnahme und Durchfall aber kein Einfluß auf das Knochenmark (Ji et al., 1981). Langzeittests mit hohen Dosierungen zeigten keinen Einfluß auf die Stammzellen der Blutbildung oder auf die DNA-Bildung. Weder das Volumen des Knochenmarks noch das Blutbild wurden verändert (Wan et al., 1981; Ji et al., 1981).

Auch Versuche an Hunden führten zu dem Ergebnis, daß selbst bei hohen Dosierungen (200 mg pro kg und Tag) Knochenmark, Blutwerte und die Nieren- und Herzfunktion nicht beeinflußt werden (Sichuan Institute of Traditional Chinese Medicine, 1981). Orale Gabe von Indirubin an Hunde (20-200 mg pro kg) über einen Zeitraum von sechs Monaten oder an Ratten (200 mg pro kg) über einen Monat verursachten dosisabhängig in der Leber eine Abnahme der RNA-Synthese und andere pathologische Veränderungen in der Ultrastruktur. Bei Hunden, die 100 mg pro Tag erhielten (das entspricht einer täglichen Dosis von etwa 2 g bei Menschen) wurde eine nur geringe Lebertoxizität beobachtet. Das heißt, klinische Dosierungen von 150 – 200 mg pro Tag sollten unter diesen Gesichtspunkten unbedenklich sein (Wen et al., 1988).

Indirubin wird sehr langsam resorbiert. Die Absorptionshalbwertszeit von tritiummarkiertem Indirubin bei Mäusen beträgt bei Infusion in den Magen bei 46 mg/kg 6 Stunden. Die Ausscheidungshalbwertszeit von i.v. gegebenen, tritiummarkiertem Indirubin beträgt 17,5 Stunden bzw. 21 Stunden nach einer Infusion in den Magen. Das Hauptorgan für den Indirubinmetabolismus ist die Leber (Qi et al., 1981).

Mit Tritium markiertes 1-Ethylindirubin reicherte sich nach oraler Gabe in neoplastischem Lungengewebe von Mäusen und Ratten doppelt so stark an wie Indirubin. Dagegen fand sich 1-Octadecylindirubin verstärkt im Gastrointestinaltrakt. Dieser Befund ist möglicherweise Ausdruck dafür, daß 1-Ethylindirubin schneller resorbiert wird, als die anderen beiden Substanzen. 1-Octadecylindirubin wird offenbar kaum resorbiert (Li et al., 1983).

2.1.4.3 Untersuchungen zum Wirkmechanismus

Indirubin beeinflußt den Zustand der Zellmembran. Die Wechselwirkung von Indirubin mit der Oberfläche von Leukozyten von Patienten mit myeloischer Leukämie steht im Zusammenhang mit Neuraminsäure, jedoch nicht mit anderen Gruppen, die ebenfalls negative Ladungen tragen, wie zum Beispiel Phosphatgruppen. Möglicherweise bindet Indirubin dabei an bestimmte Rezeptoren an der Oberfläche der Zellmembran. Strukturelle Änderungen in der Zellmembran könnten deren Durchlässigkeit beeinflussen und eine Veränderung des Zellmetabolismus und der Signal-Weiterleitung durch die Zellmembran bewirken (Wang et al., 1984). Die Fluidität von Leukozytenzellmembranen von Ratten wird durch Indirubin signifikant erniedrigt (Gan et al., 1987).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen an Leukozyten, die aus dem Blut und Knochenmark von mit Indirubin behandelten Patienten chronisch granulozytischer Leukämie entnommen wurden, zeigten eine Schwellung der Zellkernmembran, eine Schwellung und Degeneration des rauhen, endoplasmatischen Reticulums und eine Zusammendrängung der Chromosomen (Lee et al., 1979).

Derivate indigoider Bisindole inhibieren abhängig von der Verknüpfungsart der beiden Indolyliidenreste unterschiedlich stark die Proteinsynthese. Isoindigoderivate zeigen die höchste Hemmwirkung, gefolgt von Indirubin- und Indigoderivaten (Wu et al., 1985 a).

Indirubin hemmt die DNA-Synthese in Leber und Milz von W256 tragenden Ratten (Du und Ceng, 1981) und von L7212 tragenden Mäusen (Du et al., 1982). Die zellfreie DNA-Synthese durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase α wird von Indirubin konzentrationsabhängig gehemmt. Die DNA, die Polymerase und Indirubin bilden dabei wahrscheinlich einen ternären Komplex, der zur beobachteten Hemmung führt (Zhang et al., 1985). Inkubiert man DNA mit Indirubin, so wird das kurzweilige Maximum bei 207 nm zu längeren Wellenlängen verschoben, was eine nichtkovalente Bindung anzeigt. Die Bindung ist schwach. Sie kann durch Ethanol oder Gelfiltration wieder gelöst werden. Sie wird durch hohe Natriumchlorid-Konzentrationen nicht beeinflusst. Die Bindung nimmt jedoch in der Gegenwart von 8 M Harnstofflösung stark ab. Die Menge gebundener Indirubinmoleküle ist direkt proportional zur Indirubinkonzentration. Bei Kalbsthymus-DNA beträgt die maximale Bindung 46 Moleküle pro 1000 Nucleotide (Wu et al., 1982). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß sich Indirubinmoleküle möglicherweise interkalativ in die DNA-Struktur einlagern. Analog zur Hemmung der Proteinsynthese hemmen Derivate indigoider Bisindole in W256-Zellen (*in vitro* und *in vivo*) abhängig von der Verknüpfungsart der beiden Indolyliidenreste auch die DNA-Synthese. Isoindigoderivate zeigten die höchste Inhibierung, gefolgt von Indirubin- und Indigoderivaten (Wu et al., 1985 a)

Indirubin erniedrigt die Aktivität der DNA-Polymerase I. Eine dreitägige Verabreichung von Indirubin an CML-Patienten senkte die Aktivität des Enzyms der Leukozyten um 74 %. Der gleiche Effekt zeigte sich bei *in vitro*-Untersuchungen der DNA-Polymerase-I von CML-Zellen und *Escherichia coli*. Es wurde eine Hemmung des Enzyms um 32 % bzw. 52 % (Indirubin in Aceton) und 26 % bzw. 25 % (Indirubin in Liposomen) beobachtet (Gan et al., 1987).

Indirubin, 5-Iodindirubin, Indigo und Isoindigo (Niederberger, 1998) sowie 1-Methylisoindigo (Ji et al., 1991) hemmen in geringem Maß die Tubulinpolymerisation. In Tubulin sind freie Thiolgruppen essentiell für die Fähigkeit zur Polymerisation. Vorinkubation von Indirubin und 5-Iodindirubin mit GSH lieferte Hinweise darauf, daß eine Reaktion mit freien Thiolgruppen stattfinden könnte. Die Depolymerisationsfähigkeit des Tubulins wurde durch die beiden Substanzen nicht beeinflusst (Niederberger, 1998).

1-Methylisoindigo akkumuliert L1210-Zellen in der S-Phase des Zellzyklus und scheint den Übergang von G_2/M nach G_1 zu hemmen (Ji et al., 1991). Außerdem induziert es in humanen myeloblastären Leukämiezellen (ML-1) Differenzierung, die von einer verringerten *c-myb*-Genexpression begleitet ist (Liu et al., 1996).

2.2 Weitere Bisindolderivate

2.2.1 Synthesen

2,2'-Bisindol (**46**) kann aus *N,N'*-Di-*o*-tolylloxalamid (**45**) mit Natriumpentanolat (Madelung, 1912; Madelung, 1914) bei 360 °C oder mit Kalium-*tert*-Butanolat bei 300 °C (Bergman et al., 1995) dargestellt werden.

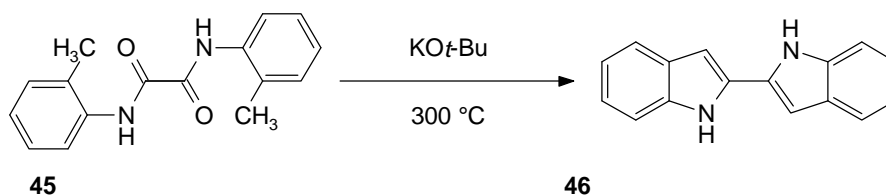


Abb. 12: Synthese von 2,2'-Bisindol (**46**) unter Schutzgas aus *N,N'*-Di-*o*-tolylloxalamid (**45**) mit Kalium-*tert*-Butanolat bei sukzessiver Temperaturerhöhung bis 300 °C (Bergman et al., 1995).

Auch die Reaktion von *N*-Phenylsulfonylindol in Ether/Hexan mit *tert*-Butyllithium und Kupfer(II)-chlorid und anschließender alkalischer Hydrolyse der Bis(phenylsulfonyl)-Verbindung liefert 2,2'-Bisindol (Bergman und Eklund, 1980). Es kann außerdem aus Bis(1-methoxyindol-2-yl) durch katalytische Hydrierung mit Pd/C und Wasserstoff synthetisiert werden. Bis(1-methoxyindol-2-yl) wird dazu in einer oxidativen Kupplung aus 1-Methoxyindol mit Butyllithium und Cu (II) dargestellt (Somei et al., 1992). Weitere Synthesemöglichkeiten bestehen in der Reduktion von Indigo mit Zink in einem Gemisch aus Essigsäure und Essigsäureanhydrid (Somei et al., 1995; Somei et al., 1997), in der Oxidation von 2-(2,3-Dihydroindol-2-yl)indol mit Sauerstoff unter Anwesenheit des *N,N'*-Bis(salicyliden)-ethylendiamin-Cobalt(II)salzes (Somei et al., 1997) oder in der Reaktion von 2-Iodindol mit 2-(Tri-*n*-butylstannyl)indol-1-carbonsäure unter der Katalyse von Dichlorobis(triphenylphosphan)palladium (Hudkins et al., 1995). Über die Bildung des entsprechenden Wittig-Ylids aus *o,o'*-[(1,2-Dioxo-1,2-ethandiyl)-bisimino]bis(benzyltriphenylphosphoniumbromid) mit Kalium-*t*-butanolat ist ebenfalls 2,2'-Bisindol zugänglich (Capuano et al., 1988).

3,3'-substituierte 2,2'-Bisindolderivate erhält man durch die Kupplung von 3-Alkyindolen und 3-Alkyl-2-chlorindolen unter Einwirkung von Bortrifluorid-Etherat (Kubo und Uchino, 1981) oder durch die Umsetzung von Oxamidderivaten zum entsprechenden 2,2'-Bisindol in einer doppelten, ortselektiven McMurry-Reaktion (Fürstner et al., 1995). 3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol (**48**) erhält man unter Argon in einer Eintopf-Reaktion aus *N,N'*-Bis(2-benzoylphenyl)oxamid (**47**) mit Titantrichlorid und Zink in trockenem 1,2-Dimethoxyethan als Lösungsmittel (**Abb. 13**) (Fürstner et al., 1995).

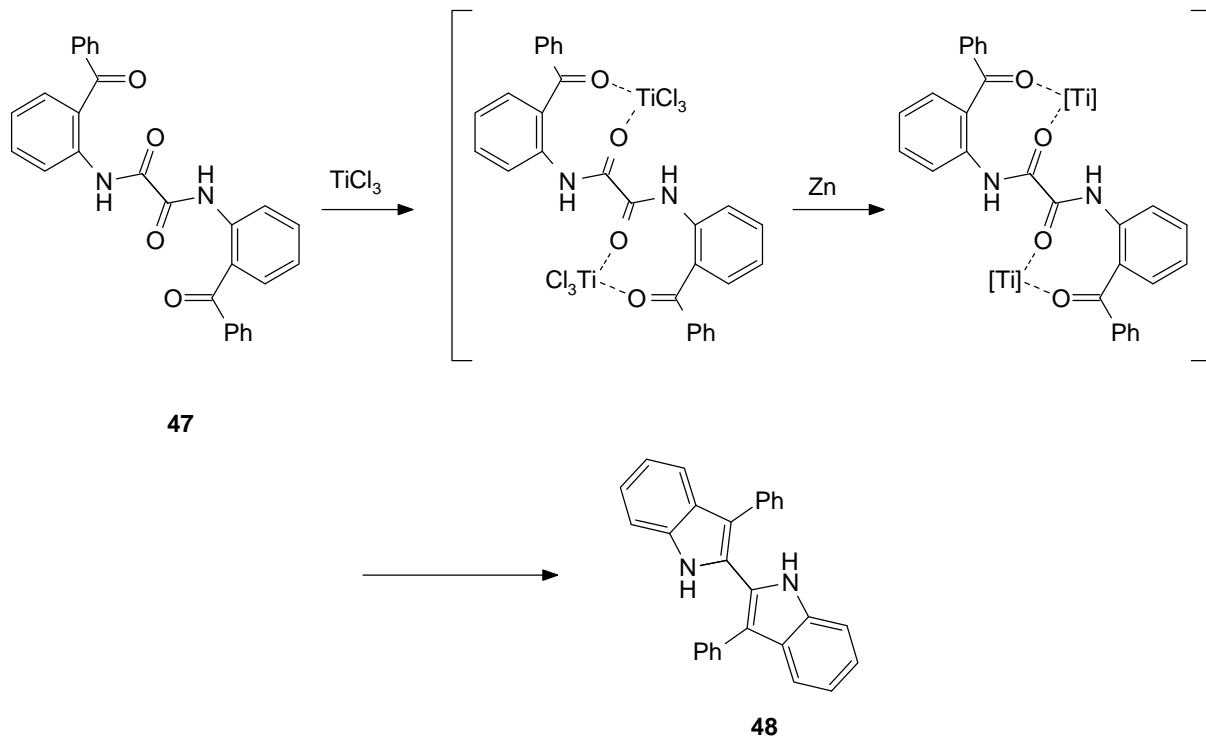


Abb. 13: Eine elegante und glatte Synthese für 3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol (**48**) durch Cyclisierung von *N,N'*-Bis(2-benzoylphenyl)-oxamid mit niedervalentem Titan im "Instant-Verfahren" nach Fürstner et al. (1995). Die Ausbildung des Chelatkomplexes zwischen niedervalentem Titan und dem Oxamidderivat bewirkt die ortselektive Ausbildung der Doppelbindungen zu den beiden Indolsystemen. Andere, hier nicht abgebildete Komplexe der niedervalenten Titanspezies mit der Dicarboxylverbindung (**47**) stehen mit den beiden abgebildeten Chelaten im Gleichgewicht (Fürstner et al., 1994).

Auch Synthesen des 2,3'-Bisindolsystems (Bergman, 1973; Black et al., 1984) und des 3,3'-Bisindolsystems (Bergman, 1968; Bergman, 1971; Berens et al., 1996) sind beschrieben.

2.2.2 Biologische Aktivität

Es gibt zahlreiche Untersuchungen zur biologischen Aktivität von nicht indigoiden 2,2'-Bisindolderivaten, die keine Drehbarkeit um die 2,2'-Bindung zwischen den beiden Indolresten aufweisen. In diese Gruppe von Verbindungen, die häufig PKC-Hemmstoffe sind und antiproliferativ wirken, gehören zum Beispiel Derivate des Staurosporins (**56a**) (O'Brian und Ward, 1990; Falbe und Regitz, 1992; Fabre et al., 1993) oder des Rebecamycins (Bush et al., 1987; Fabre et al., 1994; Arakawa et al., 1995)

Ein um die 2-2'-Bindung zwischen den beiden Indolresten drehbares 2,2'-Bisindolderivat ist das 4-(2,2'-Bisindol-3-yl)oxazolidin-2-on. Es inhibiert in geringem Maß die PKC ($\text{IC}_{50} = 81 \mu\text{M}$) aber nicht die PKA. Es wirkt als schwaches Gefäßrelaxans bei PKC-vermittelter Kontraktion der glatten Luftröhrenmuskulatur der Ratte ($\text{IC}_{50} = 38 \mu\text{M}$). Es ist antibakteriell aktiv gegen *Bacillus cereus* ATCC 14879 aber nicht gegen *Escherichia coli* ATCC 11303 und inhibiert das Wachstum von *Streptomyces chartreusis* NRRL 11407, *Streptomyces griseus* ATCC 23345 aber nicht von *Candida albi-*

cans IP 444. Es ist außerdem schwach antiproliferativ an B16-Melanom-Zellen ($IC_{50} = 42 \mu M$) aber nicht an P388 (Pereira et al., 1996; Pereira et al., 1997).

Ein nicht indigoides 3,3'-Bisindolderivat, das 3,3'-Bisindol-2,2'-tetrasulfid, zeigt fungistatische Effekte an verschiedenen Pilzen (Montanari et al. 1981). Untersuchungen zur biologischen Aktivität von nicht indigoiden 2,3'-Bisindolderivaten liegen bislang nicht vor.

2.3 Der Zellzyklus

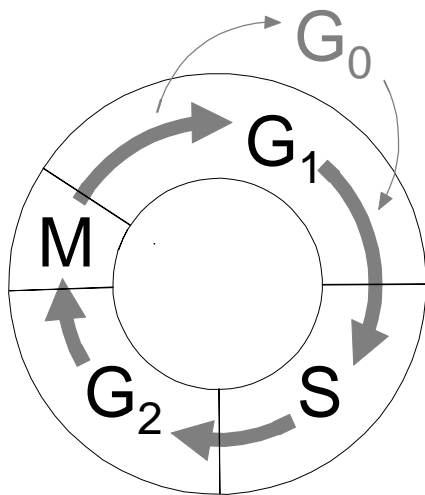


Abb. 14: schematische Darstellung der vier Phasen des Zellzyklus. Von G_1 aus können die Zellen vorübergehend oder ständig in die Ruhephase G_0 übergehen

Der Zellzyklus kann in die vier Hauptphasen M-, G_1 -, S- und G_2 -Phase gegliedert werden. In der **M-Phase** oder Mitosephase findet die Zellteilung statt. Am Ende der M-Phase beginnt die Cytokinese; zwei Tochterzellen entstehen. Nach der Zellteilung durchlaufen die Zellen die **G_1 -Phase**, wobei G (engl. *gap*, "Lücke") für den Zeitraum zwischen dem Ende der Cytokinese und dem Beginn der DNA-Synthese steht. Im Laufe dieser Phase können sich die Zellen aus dem Zellzyklus ausklinken und in die sogenannte **G_0 -Phase** übergehen, in der keine DNA-Synthese stattfindet und sich nicht mehr vermehren. Dies ist oft bei differenzierten Zellen zu beobachten. Wird der Zellzyklus weitergeführt, so gelangen die Zellen in die **S-Phase** oder Synthesephase, in der die DNA verdoppelt wird, und an deren Ende die Zellen tetra-

ploid vorliegen. In der **G_2 -Phase** bereiten die Zellen alles für die nächste Mitose vor. Die **M-Phase** wird wiederum in fünf Unterphasen eingeteilt. In der **Prophase** entstehen Centrosomen, die sich voneinander entfernen und die Spindelpole bilden. Die Mikrotubuli zerfallen. In der **Prometaphase** löst sich die Kernhülle auf, und die Kinetochor-Mikrotubuli entstehen. In der **Metaphase** wandern die Chromosomen in die Metaphaseplatte und es findet eine Paarung der homologen Chromosomen statt. In der **Anaphase** werden die Chromosomen zu den Polen gezogen. In der **Telophase** bildet sich die Kernhülle neu, und es kommt zur Entfaltung der Chromosomen zu Chromatinfäden. Während der **Cytokinese**, die in der Anaphase beginnt, umschließt die sich neu gebildete Kernhülle die dekondensierten Chromosomen, und es kommt zur Teilung der Zelle.

Während des Zellzyklus können drei sogenannte Restriktions- oder Kontrollpunkte unterschieden werden. Sie werden nur dann überschritten, wenn alle Prozesse ordnungsgemäß abgelaufen sind. Der G_1 -Kontrollpunkt (in Hefen *START* genannt) wird nur überschritten, wenn die Zelle groß genug und die Umgebung günstig für eine weitere Zellteilung ist. Der G_2 /M-Kontrollpunkt wird nur überschritten, wenn vom DNA-Replikationsmechanismus das Signal kommt, daß die DNA vollständig verdop-

pelt ist und die Umgebung sowie die Größe der Zelle weiterhin günstig für eine Teilung sind. Der Metaphasekontrollpunkt, dessen Überschreiten schließlich zum Austritt aus der Mitose und zu zwei neuen Tochterzellen führt, wird nur überschritten, wenn alle Chromosomen ordnungsgemäß an der Mitosespindel angeheftet sind (Alberts et al., 1995).

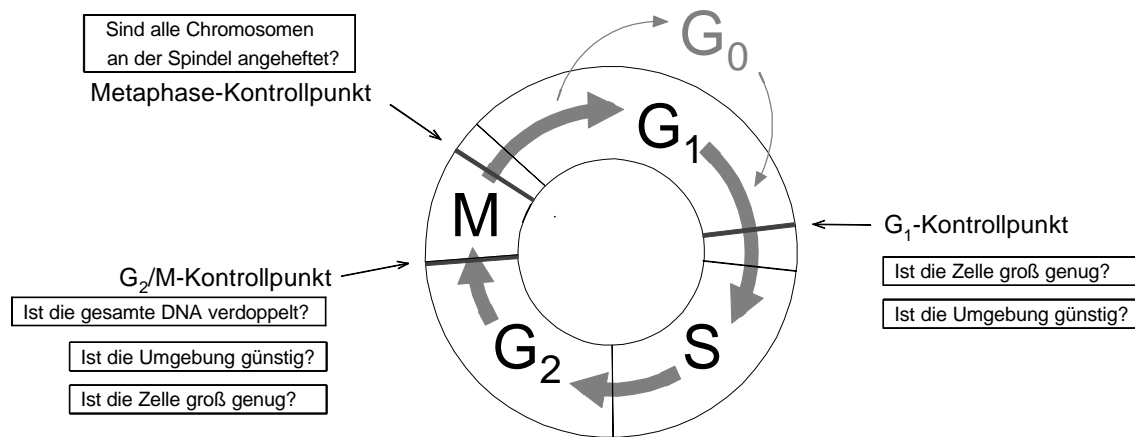


Abb. 15: Kontrollpunkte des Zellzyklus. Nach Alberts et al. (1995)

2.4 Cyclinabhängige Kinasen (CDK)

So unterschiedliche Organismen wie Hefen und Menschen haben ein in den Grundprinzipien gleiches Netzwerk aus sich gegenseitig regulierenden Proteinkinasen, die den Ablauf des Zellzyklus steuern. Im Zentrum dieses Netzwerks stehen die Cycline und cyclinabhängigen Kinasen (*cyclin dependent kinases*, CDK).

Kinasen sind eine zu den Transferasen (EC 2.-.-) gehörende Gruppe von Enzymen, die Phosphatgruppen von ATP auf andere Substrate übertragen (EC 2.7.-). Mitglieder der Superfamilie der Proteinkinasen (EC 2.7.1.-) phosphorylieren andere Proteine an Serin- und Threoninseitenketten (hierzu gehören die CDKs) oder an Tyrosinseitenketten und regeln damit deren Aktivität. Die Superfamilie der Proteinkinasen hatte im Laufe der Evolution einen gemeinsamen hypothetischen Vorfahren.

Den cyclinabhängigen Kinasen sowie den Cyclinen kommt beim Durchlaufen des Zellzyklus (*cell division cycle*, cdc) eine zentrale Rolle zu, wobei ein cyclischer Anstieg und Abfall ihrer Aktivität zu beobachten ist.

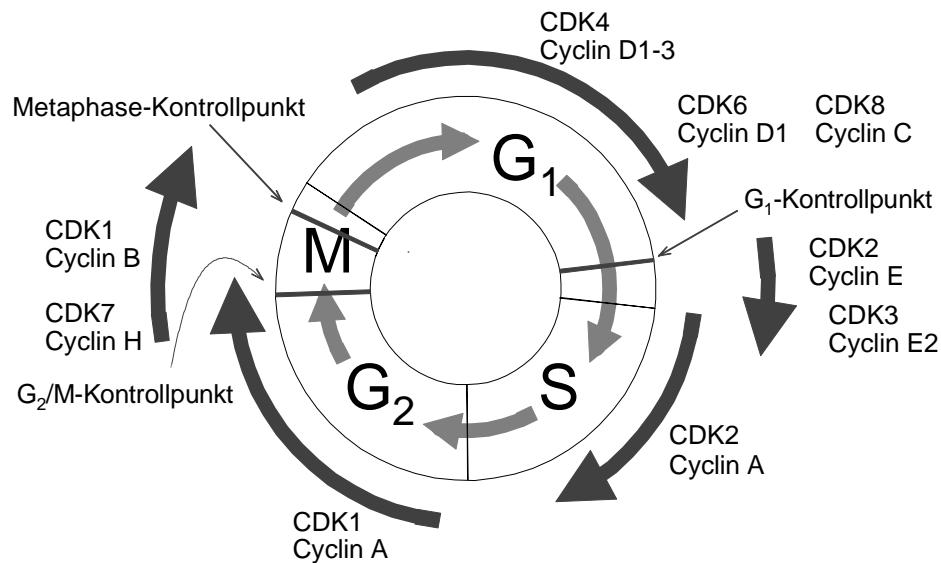


Abb. 16: Das Durchlaufen der vier Stadien des Zellzyklus ist durch einen cyclischen Konzentrationsanstieg und -abfall verschiedener Cycline gekennzeichnet, die sich jeweils mit einem Vertreter der cyclinabhängigen Kinasen (CDK) zusammenlagern. Die CDKs phosphorylieren weitere Enzyme und lösen dadurch Folgeereignisse aus, die den Fortgang des Zellzyklus bewirken wie zum Beispiel die Freisetzung von Transkriptionsfaktoren (Weinberg, 1995; Coleman et al., 1997; Meijer et al., 1997; O'Connor, 1997).

Jede CDK lagert sich im Laufe des Zellzyklus mit einem Vertreter der Cyclinfamilie zusammen. Dabei ist die Cyclineinheit der Hauptregulator der CDK-Aktivität. Bisher wurden acht humane CDK-Proteine beschrieben: CDK1 (*cdc2*, $p34^{cdc2}$), CDK2 bis CDK8. Dabei treten nur bestimmte Kombinationen von CDKs mit Cyclinen auf: **CDK1** mit Cyclin A und Cyclin B1-3, **CDK2** mit Cyclin A, Cyclin D1-3 und Cyclin E, **CDK4** mit Cyclin D1-3, **CDK5** mit Cyclin D1-3, **CDK6** mit Cyclin D1-3, **CDK7** mit Cyclin H (Coleman et al., 1997) sowie **CDK8** mit Cyclin C (Leclerc und Leopold, 1996). Erst kürzlich konnte Cyclin E2 als ein Cyclinpartner von **CDK3** identifiziert werden (Zartiwala et al., 1998). Jede Stufe im Zellzyklus wird von einer anderen Kombination aus Cyclin und CDK gesteuert. Der Wechsel von der G₁-Phase in die S-Phase hängt von den Komplexen CDK2/Cyclin E, CDK4/Cyclin D1-3, CDK6/Cyclin D1, CDK8/Cyclin C und wahrscheinlich von CDK3/Cyclin E2 ab. Das Durchlaufen der S-Phase wird von CDK2/Cyclin A geregelt. Das Durchlaufen der G₂-Phase wird von CDK1/Cyclin A und der Übergang von der G₂-Phase in die M-Phase von CDK1/Cyclin B und CDK7/Cyclin H gesteuert.

Molekularbiologisch ist bislang vor allem die Rolle der Cycline D und E (G₁-Phase) sowie der Cycline A (S- und M-Phase) und B (G₂- und M-Phase) untersucht. Das Produkt pRb des Retinoblastogens *Rb* hält im nichtphosphorylierten Zustand Transkriptionsfaktoren (vor allem E2F) gebunden, die dadurch inaktiv sind. Die Phosphorylierung von pRb durch Cyclin D im Komplex mit CDK4 und CDK6 veranlaßt pRb, die Transkriptionsfaktoren freizusetzen. Der Fortgang des Zellzyklus wird so ermöglicht, und die Zelle kann von G₁ nach S wechseln. Für Cyclin E wird ebenfalls eine Beteiligung an der Phosphorylierung von pRb diskutiert sowie an Vorgängen, die unmittelbar zur Initiation der DNA-Replikation führen (Reed, 1997; Taya, 1997). Im Komplex mit CDK2 ist Cyclin E wahrscheinlich für die Initiierung der Centrosomenduplikation verantwortlich (Hinchcliffe et al., 1999). Über die

unmittelbare Funktion der anderen Cycline liegen weniger klare Anhaltspunkte vor. Für Cyclin A im Komplex mit CDK2 konnte gezeigt werden, daß es die E2F-induzierte Genexpression inhibiert (Taya, 1997). Möglicherweise könnten Cyclin A-Komplexe also eine Art Gegenspieler zu den Cyclin D-Komplexen sein. Cyclin C scheint in die Regulationsmechanismen der Zell-Zell-Haftung (Liu et al., 1998) und, im Komplex mit CDK8, in die Kontrolle der RNA-Polymerase-II involviert zu sein (Leclerc und Leopold, 1996). Cyclin H ist im Komplex mit CDK7 an der Aktivierung von CDK1, CDK2 und CDK4 (Solomon, 1994) und an der Regulation der RNA-Polymerase II (Rickert et al., 1999) beteiligt. Auf Cyclin B, das im Komplex mit CDK1 seine Wirkungen entfaltet, wird im folgenden genauer eingegangen.

2.4.1 Regulation

Der Cyclinpartner ist der Hauptregulator der CDK-Aktivität. Durch die Bindung des Cyclinpartners ändert sich die Konformation des sogenannten *T-Loop* derart, daß ein Threonin-Rest für eine Phosphorylierung zugänglich wird. Die entsprechende Aminosäure in CDK1 ist Thr161. Eine Phosphorylierung an dieser Stelle, an Thr160 (CDK2), an Thr172 (CDK4) oder an einer analogen Aminosäure in anderen CDKs ist für die Kinasen Voraussetzung zur vollen Aktivität (Solomon, 1994; Jackman und Pines, 1997). Enzyme, die diese Phosphorylierung durchführen können, sind die CDK-aktivierenden Kinasen (CAK). Die erste CAK, die isoliert werden konnte, ist der Enzymkomplex CDK7(p40^{MO15})/Cyclin H (Mueller et al., 1995; Jackman und Pines, 1997). Die Phosphorylierung an Thr160 von CDK2 stabilisiert wiederum die Bindung an den Cyclinpartner und verbessert die Bindung zum Proteinsubstrat. Dies erklärt die Aktivierungsfunktion dieser Phosphorylierung (Russo et al., 1996). Als weitere Voraussetzung für eine vollständige Aktivierung müssen unter anderem bei CDK1 und CDK2 zwei hemmende Phosphorylierungen (an Thr14 und Tyr15) entfernt werden.

CDKs werden zudem von einer Reihe Hemmproteinen reguliert, den Inhibitoren cyclinabhängiger Kinasen (*cyclin dependent kinase inhibitors*, CKI). CKIs hemmen das Durchlaufen der G₁-Phase und die Passage des G₁/S-Kontrollpunkts (Alessandrini, 1997). Bislang wurden zwei Klassen von CKIs identifiziert. Die CKIs p21^{Cip1/Waf1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2} hemmen CDK2, CDK3, CDK4 und CDK6. Die CKIs p16^{INK4A}; p15^{INK4B}; p18^{INK4C} und p19^{INK4D} hemmen CDK4 und CDK6 (Elledge et al. 1996). Die CKIs p16^{INK4A}, p15^{INK4B} und wahrscheinlich auch p18^{INK4C} entfalten ihre Wirkung, indem sie die Cyclineinheit entfernen. Die CKIs p21^{Cip1} und p27^{Kip1} wirken ohne Entfernung der Cyclineinheit, allerdings ist der genaue Wirkmechanismus dieser Hemmung noch unklar (Meijer, 1995). Die Regulation der CKIs hängt möglicherweise wiederum von CDKs ab. Beispielsweise wird die Konzentration des CKI p27^{KIP1} über einen ubiquitinabhängigen proteolytischen Reaktionsweg geregelt. Man vermutet, daß Phosphorylierungen von Serin-/Threoninkinasen wie Erk (an Serin), aber auch von CDK1 (an Threonin), bei der Proteolyse von p27^{KIP1} eine Rolle spielen. Durch Hemmung der CDK1 wird nach dieser

Vorstellung der Abbau von p27^{KIP1} gebremst und damit der Zellzyklus verlangsamt bzw. angehalten (Alessandrini et al., 1997).

Durch den proteolytischen Abbau der Cycline wird die Aktivität der entsprechenden CDKs für den jeweiligen Durchlauf des Zellzyklus beendet. Cyclin B wird am Ende der Mitose spezifisch durch einen ubiquitinabhängigen Mechanismus abgebaut. Ohne diesen Cyclinabbau, der durch eine Ubiquitinierung an einer kurzen, N-terminalen Domäne, an der sogenannten *Destruction-Box*, vermittelt wird, kann die Zelle nicht von der Metaphase in die Anaphase überwechseln (King et al., 1994). Darauf folgend wird die aktivierende Phosphorylierung an Thr161 (CDK1) entfernt. Am Enzymkomplex CDK2/Cyclin A wurde beobachtet, daß eine Phosphatase, die sogenannte CDK-assoziierte Phosphatase (KAP, auch Cdi1) bereits an den noch aktiven Komplex aus CDK2 und Cyclin A bindet, ihre dephosphorylierende Wirkung aber erst entfalten kann, wenn der Cyclinpartner abgespalten wurde. So wird die CDK nach dem Abspalten von Cyclin A durch Entfernen der aktivierenden Phosphorylierung an Thr160 deaktiviert (Poon und Hunter, 1995). KAP bindet auch an CDK1 (Gyuris et al., 1993), in Säugerzellen sogar bevorzugt an CDK1 (Hannon et al., 1994), so daß auch hier nach dem Abbau von Cyclin B am Ende der Mitose vermutlich zwangsläufig die Dephosphorylierung von CDK1 (an Thr161) und somit Deaktivierung folgt.

Eine weitere Beeinflussung der Enzymkomplexe von CDK1 oder CDK2 geschieht durch die Anlagerung von Cks-Proteinen. Das an CDK1 gebundene Cks (p9^{Suc1/Cks}) ist unerlässlich dafür, daß vor dem Eintritt in die Mitose CDK1 den sogenannten Anaphase-Förderkomplex (APC, *anaphase-promoting-complex*, Cyclosom) phosphorylieren kann. Dieser kann nur dadurch die Ubiquitinierung und damit den Abbau von Cyclin B am Ende der Mitose steuern (Patra und Dunphy, 1998). Die Bindung von Cks an CDK1 wird durch die Bindung von Cyclin B stimuliert, allerdings nur wenn die aktivierende Phosphorylierung an Thr161 vorhanden ist. Vermutlich ermöglicht die Anlagerung der Cks-Proteine so einen gezielten Transport zu den Substraten des CDK/Cyclin-Komplexes (Egan und Solomon, 1998). Aufgrund der hohen Affinität zwischen Cks und CDK1 und CDK2, kann CDK1/Cyclin B an immobilisiertem Cks (p9^{CKShs} an Sepharose) aufgereinigt und isoliert werden (Rialet und Meijer, 1991).

2.4.2 Enzymkomplex CDK1/Cyclin B

Zu Beginn der Mitose wird der Enzymkomplex CDK1/Cyclin B in den Zellkern transportiert, und die endgültige Aktivierung erfolgt dort durch Dephosphorylierung an Thr14 und Tyr15 unter der Wirkung der doppelt-spezifischen Phosphatase cdc25 (p80^{cdc25}) (Coleman und Dunphy, 1994). Dies geschieht in zwei Stufen (Borgne und Meijer, 1996), wobei der Dephosphorylierung an Thr14 jene an Tyr15 folgt. Die kurzlebige Zwischenform mit nur einer Phosphatgruppe (an Thr14) zeigt bereits eine schwache Kinaseaktivität, weswegen spekuliert wurde (Borgne und Meijer, 1996), daß sie vielleicht an der auto-

katalytischen Amplifikation des CDK1/Cyclin B-Komplexes durch Phosphorylierung und damit Aktivierung der cdc25-Phosphatase beteiligt ist. Durch die beiden inhibierenden Phosphorylierungen an Thr14 und Tyr15 von CDK1, die durch Mitglieder der Wee-Familie bewerkstelligt werden, wird eine vorzeitige Initiation der Mitose verhindert. Wee1/Mik1 phosphoryliert an Tyr15 (Jackman und Pines, 1997). Myt1 phosphoryliert sowohl an Thr14 als auch an Tyr15 (Mueller et al., 1995; Jackman und Pines, 1997). Eine nicht vollständig replizierte DNA aktiviert zum Beispiel in *Xenopus* Wee1/Mik1 und verhindert so den Eintritt in die Mitose (Grunicke, 1995; Smythe et al., 1992).

CDK1 phosphoryliert Threonin- und Serinreste, Serin dabei effizienter als Threonin. In der Konsensussequenz für die Phosphorylierung scheint ein Prolin direkt nach Serin essentiell zu sein (Zhang et al., 1994). Wie bereits in Kapitel 2.4.1 deutlich geworden ist, stellen die CDK1/Cyclin B-Komplexe wichtige Komponenten am G₂/M-Kontrollpunkt dar. Während der Metaphase binden sie an den Spindelapparat. Ist dieser gegen Ende der Metaphase nicht ordnungsgemäß ausgebildet, so verharrt die Zelle in ihrem derzeitigen Zustand. Liegt kein Fehler vor, so wird das Cyclin B am Übergang von Meta- zu Anaphase abgebaut, wodurch CDK1 inaktiviert wird. Die Zelle kann aus der Mitose austreten (Pines, 1995). Bislang konnte noch nicht identifiziert werden, wie die Bindung zwischen Mikrotubuli und CDK1/Cyclin B vermittelt wird (Ookata et al., 1993; Fellous et al., 1994).

Auch durch einen DNA-Schaden kann es in Säugerzellen zu einer Beeinflussung des Enzymkomplexes CDK1/Cyclin B kommen. Dies kann auf zwei Wegen zu einem G₂-Arrest führen. Der DNA-Schaden kann die Aktivierung der autokatalytischen Rückkopplungsschleife zwischen CDK1 und der cdc25-Phosphatase blockieren (O'Connor et al., 1994). Dadurch kann die Phosphatase cdc25 ihren aktivsten Zustand nicht erreichen, es kann nicht zur beschleunigten Dephosphorylierung (an Thr14 und Tyr15) der CDK1 kommen, und der Eintritt in die Mitose wird verhindert. Ein zweiter Mechanismus scheint die Herunterregulierung der Cyclin B-Konzentration zu sein. Beide Mechanismen sind jedoch noch nicht im Einzelnen aufgeklärt (O'Connor, 1997).

Neben dem im Zellkern lokalisierten Histon H1 (Kawakami et al., 1996) werden auch die Untereinheiten γ und δ des Elongationsfaktors EF-1 (Abraham et al., 1994) und Vimentin an Ser-55 (Tsujimura et al., 1994) von CDK1/Cyclin B phosphoryliert. Bei verschiedenen Zelltypen korreliert der Abbau des Vimentin-Filaments zu Beginn der Mitose mit der Menge mitotisch aktivierter CDK1. Im Laufe der Cytokinese geht die Phosphorylierung von Vimentin auf Null zurück und bleibt während der Interphase auf diesem Level (Tsujimura et al., 1994). Das an intermediäre Filamente, wie Vimentin, Lamin B oder andere faserige Bestandteile des Cytoskeletts bindende Plectin wird ebenfalls von CDK1 phosphoryliert (Malecz et al., 1996).

Das als ein Auslöser von Apoptose geltende und in einem weiten Spektrum von Tumoren mutierte Tumorsuppressorgenprodukt p53, ein Transkriptionsfaktor zum Beispiel für den CKI p21^{Cip1/Waf1} wird

von CDK1/Cyclin B phosphoryliert. Möglicherweise wird dadurch seine antiproliferative Fähigkeit beeinflusst (Bischoff et al., 1990; Coleman et al., 1997).

CDK1/Cyclin B ist am mitotischen Abbau des Golgi-Apparates beteiligt (Misteli und Warren, 1995). Die Hauptphosphorylierungsstelle konnte identifiziert werden, und es konnte ausgeschlossen werden, daß MEK1, ein Mitglied des MAP-Kinase Signalwegs am mitotischen Abbau des Golgi-Apparates beteiligt ist. (Lowe et al.; 1998). Ein Proteinkomplex, der für die mitotische Chromosomenkondensation in *Xenopus*-Eiextrakten unerlässlich ist, 13S-Condensin, wird *in vitro* von CDK1 phosphoryliert. Dies deutet darauf hin, daß CDK1 die mitotische Chromosomenkondensation einschaltet (Kimura et al., 1998) Es gibt Hinweise darauf, daß das Retinoblastomgenprodukt Rb außer von CDK4/6/Cyclin D auch von CDK1/Cyclin B phosphoryliert wird (Taya, 1997; Taieb et al., 1998) Weitere molekulare Angriffspunkte von CDK1/Cyclin B wurden im Rahmen der Untersuchung proliferativer Erkrankungen wie Krebs oder der Alzheimerschen Krankheit identifiziert (siehe Kapitel 2.4.3.7).

Auch von Cyclin B wurden, wie von Cyclin D und E, verschiedene Isoenzymformen beschrieben. Cyclin B1 und Cyclin B2 sind beispielsweise in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert; Cyclin B1 in den Mikrotubuli, Cyclin B2 im Golgi Apparat. Es scheint, daß für die Aufgaben des CDK1/Cyclin B-Komplexes an verschiedenen Orten in der Zelle ein jeweils eigenes Cyclin B existiert, das jeweils auf die Induktion von Strukturänderungen in unterschiedlichen Bereichen der Zelle spezialisiert ist (Jackman et. al., 1995).

2.4.3 Hemmstoffe

Neben den oben erwähnten Hemmproteinen wurden einige niedermolekulare Naturstoffe und synthetisch dargestellte Inhibitoren beschrieben. Mehrere potentielle Angriffspunkte für solche CDK-Inhibitoren sind denkbar. Es kann eine kompetitive Hemmung des Substrates (ATP oder zu phosphorylierendes Enzym) stattfinden. Ein Hemmstoff kann mit dem *T-loop*-Phosphothreonin (Thr161 in CDK1) interagieren. Die Bindung zwischen der CDK und dem Cyclinpartner oder mit der Proteinuntereinheit p9^{CKShs} kann beeinflusst werden. Die sogenannten *P-Box* im Cyclinpartner, ein Bereich der für die Interaktion mit der aktivierenden Phosphatase cdc25 verantwortlich oder cdc25 selbst kann Angriffspunkt sein. Jene Stellen im Protein können beeinflusst werden, die für die zelluläre Lokalisation verantwortlich sind. Und schließlich ist eine Nachahmung des Effekts von Proteininhibitoren oder eine Beeinflussung des Signals zum Cyclinabbau denkbar (Meijer, 1995; Meijer, 1996). Die meisten Studien beschäftigten sich bislang mit der kompetitiven Hemmung der ATP-Bindung.

2.4.3.1 Identifizierung

Die Identifizierung von Hemmstoffen findet meist an den isolierten CDK/Cylin-Komplexen statt. Die Enzyme oder Enzymkomplexe werden aus reichhaltigen Quellen gewonnen, wie zum Beispiel CDK1/Cylin B aus Seesternoozyten (Rialet und Meijer, 1991). Die Aufreinigung erfolgt in diesem Fall an $p9^{CKShs}$ -Sephrose. Die Kinaseaktivität wird durch die Menge der auf ein entsprechendes Substrat (Histon H1, Protein des Retinoblastomgens, synthetische Peptide) übertragenen, radioaktiv markierten Phosphatgruppen in Gegenwart steigender Konzentrationen der potentiellen Inhibitoren bestimmt. Aus Konzentrations-Kinaseaktivitäts-Diagrammen wird der IC_{50} -Wert bestimmt (Azzi et al. 1994; Rialet und Meijer, 1991).

Die CDK1-aktivierende Phosphatase cdc25 kann zum Beispiel durch Expressieren eines rekombinanten Glutathion-S-Transferase/cdc25-Fusionsproteins in *Escherichia coli* gewonnen werden und durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose aufgereinigt werden. Der Assay basiert in diesem Fall auf der Farbreaktion, die durch aktives Protein bei Hydrolyse von *p*-Nitrophenylphosphat eintritt. Das im Alkalischen entstehende Phenolat-Ion absorbiert bei einer Wellenlänge von 410 nm, wodurch eine photometrische Auswertung möglich ist (Baratte et al., 1992).

2.4.3.2 Strukturen, Wirkstärken, Selektivität

Eine ganze Reihe strukturell sehr unterschiedlicher Typen natürlicher oder von Naturstoffen abgeleiteter CDK-Hemmstoffe sind beschrieben.

Butyrolacton-I (49) (Kitagawa et al., 1994; Someya et al., 1994) wurde ursprünglich im Schimmelpilz *Aspergillus terreus* var. *africanus* identifiziert.

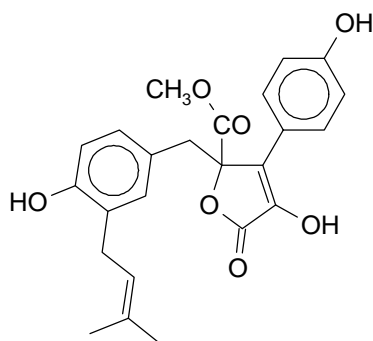


Abb. 17: Butyrolacton-I (49)

9-Hydroxyellipticin (50) (Ohashi et al., 1995) wurde halbsynthetisch ausgehend von einer Substanz aus einem Extrakt der Pflanzen *Ochrosia elliptica* und *Ochrosia acuminata* gewonnen.

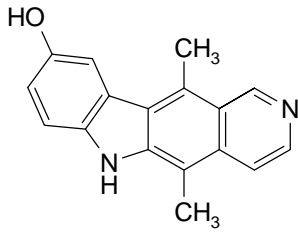


Abb. 18: 9-Hydroxyellipticin (50)

Suramin (55) ist ein symmetrisches Harnstoffderivat amidisch verknüpfter 3-Aminobenzoesäuren und zweier trisulfonierter Naphthylamine. Suramin wird seit fast 70 Jahren gegen die Schlafkrankheit (Trypanosomiasis) und andere parasitäre Erkrankungen eingesetzt, zeigt Aktivität gegen das HI-Virus (Hemmung der reversen Transkriptase) sowie gegen einige metastasierende Krebsarten (Larsen, 1993) und befindet sich z. Zt. in klinischen Studien gegen verschiedene Krebserkrankungen (Grossman, 1998; Tu et al., 1997). Die Antitumorwirkung von Suramin wird im allgemeinen auf seinen Einfluß auf die Bindung an Wachstumsfaktoren zurückgeführt (Grunicke, 1995), jedoch können aufgrund der geringen Spezifität von Suramin auch andere Wirkmechanismen nicht ausgeschlossen werden. So könnte der antiproliferative Effekte auch auf der Inhibierung von CDKs, insbesondere von CDK1 beruhen (Bojanowski et al., 1994; Coleman, 1997).

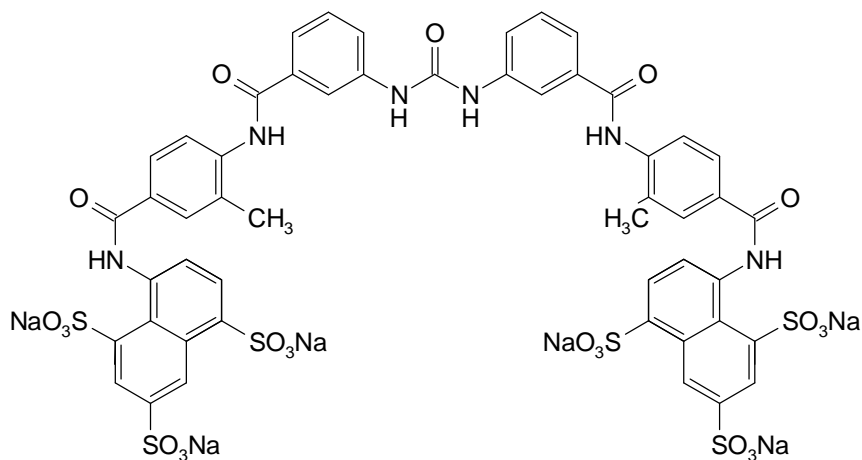


Abb. 19: Suramin (55)

Staurosporin (56a) (Gadbois et al., 1992; Rialet und Meijer, 1994) ist ein Indol-Alkaloid und wird von *Streptomyces staurosporeus* und anderen *Streptomyces*-Arten gebildet. Es wirkt stark blutdrucksenkend, ist ein Antimykotikum und hemmt die Blutgerinnung. Es wird im allgemeinen als PKC-Hemmstoff beschrieben, hemmt jedoch recht unspezifisch eine große Reihe von Kinasen. Staurosporin (56a) zeigt antikanzerogene Eigenschaften (Gescher, 1995; Bradshaw et al. 1993; O'Brian und Ward, 1990). Ein Derivat von Staurosporin, **UCN-01 (56b)** befindet sich in einer klinischen Phase-I-Studie gegen schwer behandelbare, solide Tumoren und gegen Lymphome (Sausville, 1998). Seine relativ geringe *in vitro*-Spezifität und die starke strukturelle Ähnlichkeit zu Staurosporin läßt jedoch,

wie bei Suramin, keine fundierte Aussage über das oder die *in vivo*-Zielproteine zu (Coleman et al. 1997).

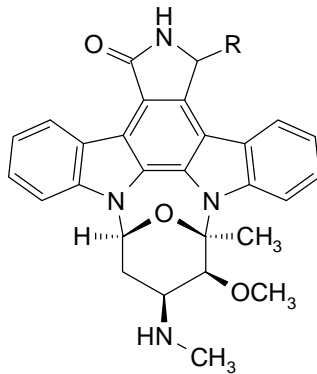


Abb. 20: Staurosporin (**56a**) (R = H) und UCN-01 (**56b**) (R = Cl)

Das Flavonoid **Flavopiridol** (Kaur et al., 1992; Worland et al. 1993; Losiewicz et al., 1994; Azevedo et al., 1996) ist ein semisynthetisches Derivat eines Stoffes aus der Pflanze *Dysoxylum binectariferum*, die in Indien heimisch ist und dort in der Volksmedizin verwendet wird. Es wird in klinischen Studien gegen zahlreiche bösartige Tumoren eingesetzt (Drees et al., 1997, Senderowicz et al., 1998; Stinson et al., 1998; Wright et al., 1998), und ist bislang am effektivsten gegen Prostatakrebs (Sedlacek et al., 1996). Im Hinblick auf die antineoplastische Therapie ist es momentan der vielversprechendste CDK-Inhibitor, zumal es die erste Substanz in klinischer Prüfung ist, deren Wirkprinzip mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Inhibierung von CDKs zurückgeführt werden kann (Coleman, 1997).

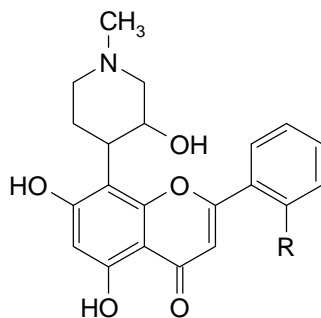


Abb. 21: Flavopiridol (L86 8275) (**59a**) (R = Cl) und L86 8276 (R = H) (**59b**)

Purinderivate wie **Olomoucine** (**52**) und **Isopentenyladenin** (**51**) (Rialet und Meijer, 1991), **Roscovitin** (Meijer et al., 1997; De Azevedo et al., 1997) sowie die **Purvalanole A** und **B** (Gray et al. 1998) leiten sich von 6-Dimethylaminopurin ab, das wiederum aus Puromycin, einem Nucleosid aus *Streptomyces*-Arten, dargestellt wurde.

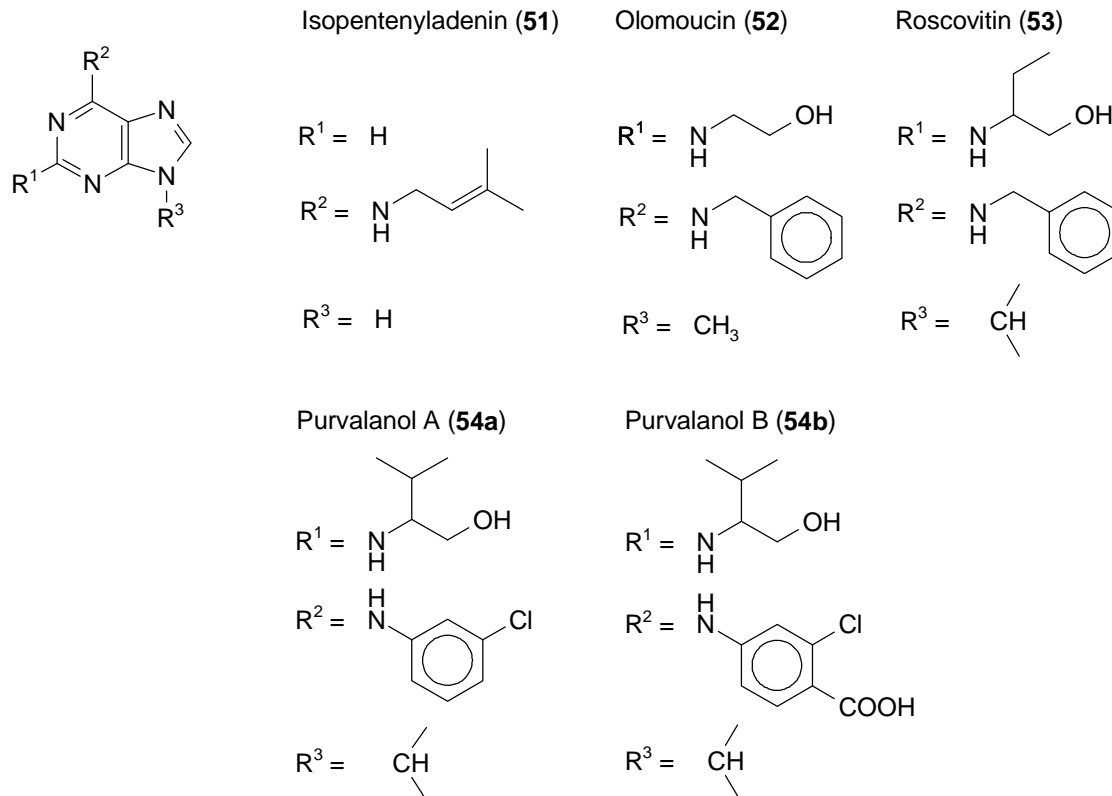


Abb. 22: CDK-Hemmstoffe mit Adeningrundgerüst

Nachdem das Purinderivat Olomoucine ($IC_{50} = 7,0 \mu M$) als Hemmstoff des Enzymkomplexes CDK1/Cyclin B entdeckt worden war (Veselý et al., 1994), wurde in einer Reihe weiterer C2-, N⁶- und N9-substituierter Adeninderivate Roscovitine als Verbindung mit verbesserter Hemmwirkung ($IC_{50} = 0,65 \mu M$) und hoher Selektivität gegenüber anderen Kinasen gefunden. Eine gute Hemmwirkung von Roscovitine zeigte sich auch bei drei weiteren CDK/Cyclin-Komplexen (CDK2/Cyclin B und CDK2/Cyclin A: $IC_{50} = 0,70 \mu M$), und die stärkste Hemmwirkung entfaltet Roscovitine gegenüber CDK5 im Komplex mit einem bisher nicht näher identifizierten Protein p35 ($IC_{50} = 0,16 \mu M$). Gegenüber anderen Kinasen wie zum Beispiel CDK4/Cyclin D1, CDK6/Cyclin D3, PKC, PKA, c-Src, v-Abl oder anderen liegt der IC_{50} -Wert über $100 \mu M$. Auf der Basis dieser Untersuchungen kann man die CDK-Familie in zwei Subfamilien unterteilen. So werden CDK1, CDK2 und CDK5 zu der Subfamilie der sensitiv auf Olomoucine und Roscovitine reagierenden CDKs gezählt und CDK4 sowie CDK6 zu der Olomoucine- und Roscovitine-insensitiven Subfamilie. Eine Unterteilung, die sich in gleicher Weise ergibt, wenn man von der durch Staurosporin oder Butyrolacton-I erzeugten Hemmwirkung ausgeht. Ein Grund für die unterschiedliche Reaktion auf den gleichen Hemmstoff innerhalb der Familie der cyclinabhängigen Kinasen mag in ihrer verschiedenen entwicklungs geschichtlichen Verwandtschaft liegen. So zeigen CDK1 und CDK2 bzw. CDK5 eine Homologie von 65 % bzw. 57 %, CDK1 und CDK6 bzw. CDK4 jedoch nur eine Homologie von 47 % bzw. 44 %. CDK4 und CDK6 zeigen zueinander eine Homologie von 71 %.

Struktur-Aktivitätsstudien ergaben, daß die Positionen 1, 3 und 7 des Puringerüsts unsubstituiert bleiben müssen, um nicht die Hemmwirkung der Substanzklasse auf CDK1 zu verlieren. Außerdem hat eine Änderung der Substituenten in Position 2 und 9 von Roscovitin einen dramatischen Rückgang in der Hemmwirkung auf CDK1 zur Folge (Havlíček et al., 1997). Mit Hilfe kombinatorischer Methoden gelang es, die Wirksamkeit im Vergleich zu Roscovitin bis um den Faktor 100 zu steigern (Gray et al.; 1998). Die gefundenen Verbindungen, Purvalanol A (**54a**) und Purvalanol B (**54b**), zeigten dabei weiterhin eine hohe Selektivität in Bezug auf andere Kinasen.

Tab. 4: Spezifität bekannter Hemmstoffe cyclinabhängiger Kinasen (IC₅₀-Werte in µM)

| Enzym | Staurosporin (56a) ¹⁾ | UCN-01 (56b) ¹⁾ | Butyrolacton-I (49) ¹⁾ | Flavopiridol (59a) ¹⁾ | Olomoucine (52) ¹⁾ | Roscovitin (53) ¹⁾ | Purvalanol A (54a) ²⁾ | Purvalanol B (54b) ²⁾ | 9-Hydroxyellipticin (50) ¹⁾ |
|----------------|---|-------------------------------------|--|---|--|--|---|---|---|
| CDK1 | 0,003-0,009 | 0,031 | 0,60 | 0,40 | 7 | 0,65 ^a | 0,004 | 0,006 | ca. 1 |
| CDK2 | 0,007 | 0,030 | 1,50 | 0,40 | 7 | 0,70 | 0,035-0,070 | 0,006-0,009 | nb |
| CDK4 | <10,000 | 0,032 | kein Effekt | 0,40 | >1000 | >100 | 0,85 | >10 | nb |
| MAPK | 0,020 | 0,910 | 94 | nb | 30 | 30 | 9 | 3,3 | nb |
| PKA | 0,008 | nb | 260 | 145 | >2000 | >1000 | 9 | 3,8 | nb |
| PKG | 0,009 | nb | nb | 6 | >2000 | >1000 | > 10 | > 100 | nb |
| PKC | 0,005 | 0,007 | 160 | nb | >1000 | >100 | > 10 | > 10 | nb |
| Tyrosinkinasen | 0,006 (EGF-R) 0,006 (Src) | nb | >590 (EGF-R) | 25 (EGF-R) | 440 (EGF-R) | 70 (I-R) | 5 (I-R) | 2,2 (I-R) | nb |

CDK: Cyclinabhängige Kinase; MAPK: Mitogen aktivierbare Proteinkinase; PKA: cAMP-abhängige Proteinkinase; PKG: cGMP-abhängige Proteinkinase; PKC: Proteinkinase C; EGF-R: Rezeptor-Tyrosinkinase; Epidermaler Wachstumsfaktor; I-R: Insulinrezeptor-Tyrosinkinase; nb: nicht bestimmt;

^aIC₅₀-Wert für das racemische Gemisch; IC₅₀ für (R)-Roscovitin beträgt 0,45 µM (Meijer, 1996).

¹⁾Meijer et al. (1996); ²⁾Gray et al. (1998).

Der Wirkmechanismus der Hemmung beruht, soweit er aufgeklärt ist (Staurosporin, **56a** [Lawrie et al., 1997], Butyrolacton-I, **49** [Kitagawa et al., 1993], Flavopiridol, **59** [Losiewicz et al., 1994; De Azevedo, 1996] Olomoucine, **52** [Abraham et al. 1995], Roscovitin, **53** [De Azevedo, 1997, Veselý et al., 1994], Purvalanol B, **54b** [Gray et al., 1998]), auf einer kompetitiven Hemmung der ATP-Bindung. Die meisten der Hemmstoffe sind wenig selektiv (siehe **Tab. 4**). Die stärksten bislang bekannten Hemmstoffe von CDK1 sind Staurosporinderivate (IC₅₀ = 0,003-0,03 µM). Diese Stoffklasse hemmt aber sehr unselektiv gleichzeitig auch ein breites Spektrum weiterer Kinasen. Höhere Selektivität zeigen Butyrolacton-I, Flavopiridol, Olomoucine und Roscovitin sowie die beiden Purvalanole **54a** und **54b**.

Ein als antiproliferativ beschriebener Inhaltsstoff des Knoblauchs, das **Diallyldisulfid (57)** hemmt in humanen Dickdarmkrebszellen (HCT-15) die CDK1-Aktivität und verursacht einen reversiblen G₂/M-Arrest (Knowles und Milner, 1998).

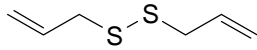


Abb. 23: Diallyldisulfid (57)

Das in bestimmten, selenanreichernden Pflanzen, wie zum Beispiel *Astragalus bisculatus* aus der Familie der Fabaceae (Böck, 1999) vorkommende **Methylselenocystein (58)** hemmt in Mausbrustkrebszellen (TM6) die CDK2-Aktivität, jedoch nicht die CDK4-Aktivität und bewirkt einen Arrest in der S-Phase des Zellzyklus (Sinha und Medina, 1997).

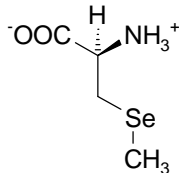


Abb. 24: Methylselenocystein (58)

Im Rahmen von Untersuchungen der durch das karzinogene Arsenat(III) induzierten cytogenetischen Veränderungen, wie zum Beispiel Schwesterchromatidenaustausch oder chromosomaler Aberrationen, wurde gefunden, daß **Natriumarsenat(III)** in humanen Hautfibroblasten (HFW) im Vergleich zu unbehandelten Zellen einen verlangsamten Abbau von Cyclin B1 und eine Hyperphosphorylierung von CDK1 bewirkt und ein verspätetes Auftreten der G₂- und M-Phase sowie eine verlängerte Mitosephase induziert (Yih et al. 1997).

2.4.3.3 Röntgenstrukturanalyse (RSA)

Die Röntgenstrukturanalyse (RSA) stellt eine der aussagekräftigsten Methode zur Untersuchung von Enzym-Inhibitor-Wechselwirkungen dar, vorausgesetzt das Protein läßt sich in kristalliner Form gewinnen. Dies gelang in der Gruppe der CDKs bisher nur mit CDK2.

ATP (De Bondt et al., 1993; Schulze-Gahmen et al., 1995; Schulze-Gahmen et al., 1996) und fünf Inhibitoren wurden mit CDK2 kokristallisiert und die Struktur des Enzym-Inhibitor-Komplexes bestimmt: Isopentenyladenin (Schulze-Gahmen et al., 1995), Olomoucine (Schulze-Gahmen et al., 1995), das Flavon L86 8276 (**59b**) (De Azevedo et al., 1996), Roscovitin (De Azevedo et al., 1997) sowie Purvalanol B (Gray et al., 1998). Alle fünf Inhibitoren sitzen in der ATP-Bindungstasche, zwischen der kleinen und großen Domäne (De Bondt et al. 1993) der Kinase.

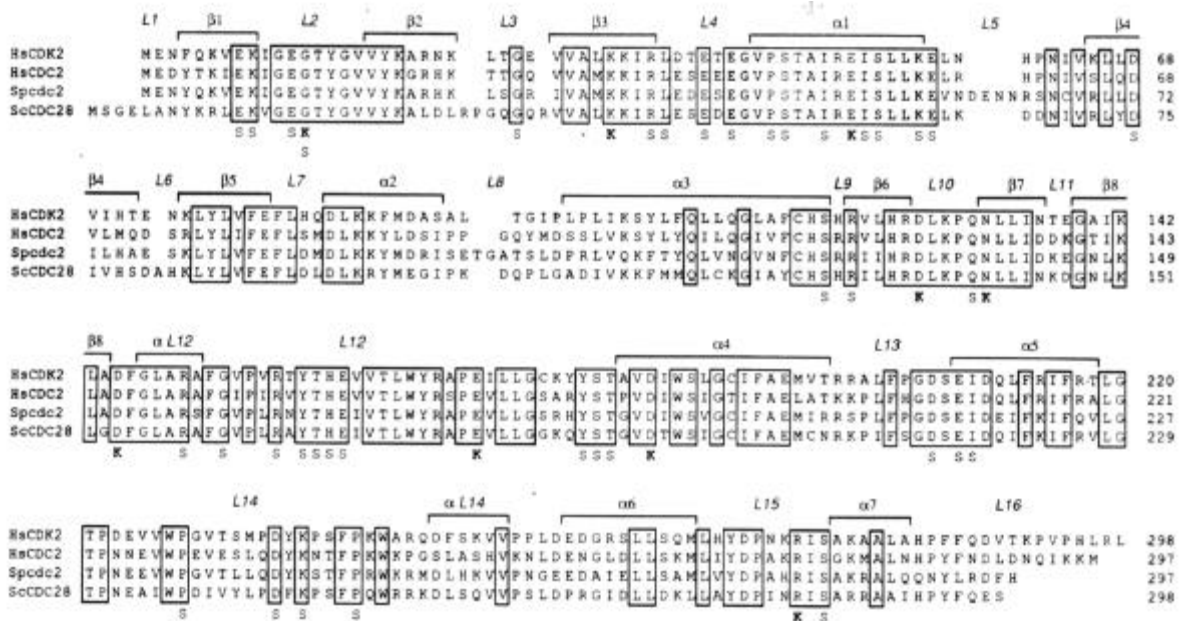


Abb. 25: Aminosäuresequenzen von humaner CDK2 (1. Zeile), humaner CDK1 (2. Zeile), CDK1 von *Schizosaccharomyce pombe* (3. Zeile) und *cdc28* von *Saccharomyces cerevisiae* (4. Zeile). Die Kästen zeigen Sequenzhomologien zwischen allen vier Kinasen auf. Die jeweilige Sekundärstruktur von CDK2 ist über der Sequenz angegeben (α = α -Helixstruktur, β = β -Faltblattstruktur) (aus De Bondt et al., 1993).

40 % aller Kontakte zwischen Roscovitin und Enzym gehen von drei Aminosäuren aus: Ile10, Leu83 und Leu134. Das Purinringsystem befindet sich in etwa im gleichen räumlichen Bereich der Bindungstasche, wie jenes von ATP, jedoch ist die Lage der beiden Ringsysteme völlig unterschiedlich. Das Stickstoffatom N7 von Roscovitin kommt ungefähr auf die Position von N1 von ATP. Vermutlich erklärt sich dies durch die 22 van-der-Waals-Wechselwirkungen, die Roscovitin aufgrund seiner 6-Benzylaminogruppe mit Aminosäureresten außerhalb der ATP-Bindungstasche eingehen kann. Ein Raumbereich, der von ATP nicht belegt wird und so zusätzlichen Energiegewinn bringt (De Azevedo et al., 1997). Die interagierenden Aminosäuren dieser Bindungsdomäne sind nur in CDK-Proteinen konserviert - ein Erklärungsansatz für die Spezifität gegenüber anderen Kinasen (Meijer, 1996).

Der Tetrahydropyranring von Staurosporin liegt in der ATP-Bindungstasche in der Wannenkongformation vor. Das Stickstoffatom N1 von Staurosporin bildet mit dem peptidischen Sauerstoff von Glu81 eine Wasserstoffbrückenbindung aus. Das Sauerstoffatom O5 von Staurosporin bildet mit dem Amidstickstoff des Leu83 eine Wasserstoffbrückenbindung aus. Dieses Bindungsmuster ähnelt dem von Isopentenyladenin, L86 8276 (59b) und ATP (Lawrie et al., 1997). Eine dritte Wasserstoffbrückenbindung bildet sich zwischen der Methylaminogruppe (N4) am Glycosylrest von Staurosporin und

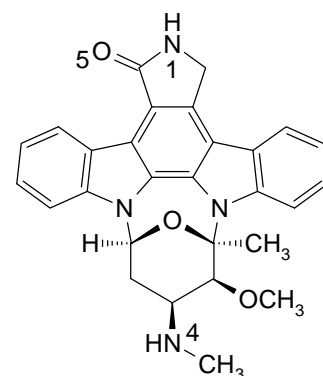


Abb. 26: Staurosporin (56a)

dem Carbonylsauerstoffatom der Seitenkette von Gln131 und/oder der Carboxylgruppe von Asp86 aus. In der CDK2-ATP-Struktur wechselwirken diese Aminosäureseitenketten mit den Hydroxylgruppen in 2'- und 3'-Stellung der Ribosegruppe.

Bisher wurden nur monomere (CDK ohne Cyclinpartner) und somit eigentlich "inaktive" Enzym-Inhibitor-Komplexes kokristallisiert und vermessen. Unterschiede in der Bindung der Inhibitoren zur "aktiven" Form müssen deshalb in Betracht gezogen werden.

2.4.3.4 Wirkung von CDK-Inhibitoren auf die Zelle

Was ein Inhibitor eines Enzyms in der Zelle bewirkt, und ob ein beobachteter Effekt ausschließlich auf die Hemmung dieses einen Enzyms zurückzuführen ist, muß stets mit großer Bedachtsamkeit beurteilt werden. Zahlreiche Effekte (Meijer 1996) können dazu beitragen, daß ein an isolierten Enzymen hochwirksamer und hochselektiver Wirkstoff in einer lebenden Zelle unerwartete Eigenschaften aufweist. Allerdings häufen sich die Indizien dafür, daß für die beobachteten Effekte an Zellen, die mit CDK-Hemmstoffen behandelt wurden, tatsächlich die Hemmung der CDKs verantwortlich ist. Werden in der Zelle Phosphorylierungen durch CDKs gehemmt, die auch am isolierten Enzym gehemmt werden, wie zum Beispiel die Phosphorylierung von Histon H1 durch CDK1, so ist dies ein starkes Indiz dafür, daß auch in der Zelle die CDK das Target darstellt. So wird durch Butyrolacton-I die Phosphorylierung von Histon H1 in humanen WI38-Zellen (Kitagawa et al., 1994) und durch UCN-01 in humanen A549-Zellen gehemmt (Kawakami et al., 1996). An vielen Modellen konnte gezeigt werden, daß die zwei Haupteffekte von nichtpeptidischen CDK-Inhibitoren auf den Zellzyklus in einer Arretierung in der späten G₁-Phase (Kaur et al., 1992; Kitagawa et al., 1994; Someya et al., 1994; Rudolph et al., 1996; Meijer et al., 1997) und in der späten Prophase (Kaur et al., 1992; Veselý et al., 1994; Abraham et al., 1995; Meijer et al., 1997) bestehen. Dies wurde an synchronisierten oder teilsynchronisierten Zellen gezeigt, in denen diese Effekte leichter zu beobachten sind als an völlig unsynchronisierten Zellen (Ongkeko et al., 1995).

Durch Olomoucine und Roscovitine wird die Phosphorylierung der Untereinheiten γ und δ des Elongationsfaktors (EF-1) sowohl an den isolierten Enzymen als auch in *Xenopus*-Oozyten gehemmt (Abraham et al., 1995; Meijer et al., 1997). Roscovitine bewirkt außerdem einen Zellzyklusarrest von Seesternooozyten und Seeigelembryonen in der Prophase und hemmt den Abbau der Kernhülle in Seesternooozyten (Meijer et al., 1997). Die Beobachtung, daß die Phosphorylierung des Retinoblastomgenprodukts, pRb, eines der Zielproteine der CDK-Aktivität, gehemmt wird (Kitagawa et al., 1993 und 1994; Kawakami et al., 1996), ist ebenfalls ein Indiz dafür, daß tatsächlich in der Zelle eine Hemmung der CDKs stattfindet.

Zahlreiche CDK-Inhibitoren wurden am NCI-Panel 60 humaner Tumorzelllinien getestet (Abraham et al., 1995; Meijer et al., 1997; Gray et al., 1998). Dies ist ein Test auf Wachstumshemmung an Zelllinien, die einen großen Bereich humaner Tumorarten abdecken (Leukämien, Lungenkarzinome, Kolonkarzinome, Tumoren des Nervensystems, Melanome, Ovarialkarzinome und Nierenkarzinome). Zur Beurteilung der allgemeinen Wirksamkeit einer Substanz wird der durchschnittliche IC_{50} -Wert herangezogen. Ihr Wirkprofil, das sich durch Auftragung der einzelnen IC_{50} -Werte in Form eines Balkendiagramms ergibt, liefert Hinweise auf den Wirkmechanismus (Boyd und Paull, 1995).

Roscovitin hemmt zahlreiche Vorgänge, die im Zusammenhang mit dem Zellzyklus stehen. Am NCI-Panel von 60 humanen Tumorzelllinien ergab sich für Roscovitin ein durchschnittlicher IC_{50} -Wert von 16 μ M (Meijer et al., 1997).

Bei der Testung am NCI-Tumorpanel hatte Purvalanol A einen durchschnittlichen IC_{50} -Wert von 2 μ M. Zwei Tumorzelllinien zeigen herausragende Sensitivitäten: ein nichtkleinzelliger Lungenkrebs (HCl-H522) mit einem IC_{50} -Wert von 0,35 μ M und ein Colonkarzinom (KM 12) mit einem IC_{50} -Wert von 0,076 μ M. Durchflusszytometrische Messungen an humanen Lungenfibroblasten zeigten bei niedrigen Konzentrationen einer verwandten Verbindung eine Hemmung des G_1/S -Übergangs und bei hohen Konzentrationen zusätzlich eine Hemmung des G_2/M -Übergangs (Gray et al., 1998).

2.4.3.5 Apoptose

Apoptose, auch aktiver oder programmierter Zelltod genannt, tritt als Resultat einer Entscheidung der Zelle auf, die auf Informationen aus der Umgebung, ihrer Wechselwirkung mit anderen Zellen, ihres eigenen inneren Metabolismus oder ihrer Entwicklungsstufe basiert (Kondo, 1995). Apoptose ist ein im genetischen Material verschlüsselt vorliegendes Programm, dessen Ablauf durch charakteristische zellmorphologische und biochemische Veränderungen den Zelltod herbeiführt (Wyllie, 1985). Die zentrale Komponente der apoptotischen Vorgänge ist ein proteolytisches System, in dem besonders die Proteasefamilie der Caspasen eine Rolle spielt. Aus einer Reihe von proapoptotischen Signalen, wie zum Beispiel der mitochondrialen Freisetzung des Caspase-Aktivators Cytochrom C (Green und Reed, 1998), resultiert die Aktivierung dieser Enzyme, die dann mit der Auflösung der Zelle beginnen (Thornberry und Lazebnik, 1998). Die meisten Chemotherapeutika scheinen, wie auch die Bestrahlung mit ionisierender Strahlung, im Endeffekt über eine verstärkt induzierte Apoptose ihre antineoplastische Wirkung zu entfalten (Fisher, 1994). So könnten möglicherweise auch chemische Inhibitoren der CDKs die Koordination der einzelnen Stationen im Zellzyklus stören oder unterbrechen, dabei Kontrollpunktmechanismen aktivieren und so die Tumorzellen zur Apoptose treiben (Meijer, 1995; Meijer, 1996).

Das Verhalten von CDK-Inhibitoren gegenüber apoptotischen Vorgängen ist allerdings nicht einheitlich. Es wurden sowohl apoptoseinhibierende als auch apoptoseaktivierende Eigenschaften von CDK-Hemmstoffen beobachtet.

Bei in der S-Phase arretierten Hela-Zellen, in denen Apoptose induziert worden ist, ist die Kondensation des Chromatins, ein typisch apoptotischer Vorgang, von einer Aktivierung der CDK1 und der CDK2 begleitet (Meikrantz et al., 1994). Im Vorfeld der Apoptose fördert eine DNA-Schädigung in HL60-Zellen die vorübergehende und außerplanmäßige Stimulation des CDK1/Cyclin B-Komplexes (Shimizu et al., 1995). Einige neuronale Zelltypen gehen in der Gegenwart von DNA-schädigenden Agentien in die Apoptose. Durch Olomoucine und Flavopiridol kann in diesen Zelltypen der Vorgang verhindert werden (Park et al., 1996). Durch die Überexpression der CDK-Inhibitoren p21^{Cip1} und p16^{INK4A} kann in murinen, sich differenzierenden Myeloblasten die Apoptose inhibiert werden (Wang und Walsh, 1996). Taxol induziert in humanen Brustkrebszellen (MCF 7) CDK1-Kinaseaktivität (Shen et al., 1998). In solchen Fällen scheinen CDK-Inhibitoren den programmierten Zelltod zu verhindern (Meijer, 1996).

In bestimmten, zur Proliferation fähigen Nervenzellen wird durch Flavopiridol und Olomoucine verstärkt Apoptose ausgelöst (Park et al., 1996). Olomoucine übt einen stark stimulierenden Effekt auf die p53-unabhängige Apoptose in tsFT210 Maus-Mammakarzinomzellen aus. Werden in diesen Zellen durch DNA-schädigende Agentien, wie Mitoxantron oder Cis-Platin DNA-Strangbrüche erzeugt und sind vor oder während der Schädigung die CDK-Inhibitoren Olomoucine oder Butyrolacton-I anwesend, erhöht sich nachfolgend die Rate der aus der G₂-Phase heraus erfolgenden Apoptose. In Säugerzellen existiert daher möglicherweise eine apoptosehemmende Form der CDK1. Diese Form der CDK1 könnte in G₂-arretierten Zellen aktiv sein und wäre daher vermutlich nicht identisch mit dem die Mitose vorantreibenden CDK1/Cyclin B-Komplex (Ongkeko et al., 1995). Auch die apoptoseinduzierenden Effekte von Roscovitine sind p53-unabhängig. Nach diesen Befunden wird also in proliferierenden Zellen als Folge einer CDK-Hemmung Apoptose ausgelöst (Meijer, 1996).

Unabhängig davon ob in den Zellen das Tumorsuppressorgenprodukt p53 in seiner Wildtypform oder mutiert vorliegt oder nicht vorhanden ist, wird das Zellwachstum von CDK-Inhibitoren gehemmt (Ongkeko et al., 1995; Meijer 1996). Die Auslösung der Apoptose durch CDK-Inhibitoren läuft deshalb vermutlich über einen Signalweg der p53-unabhängig ist. Dies ist ermutigend im Hinblick auf die Entwicklung antineoplastischer Wirkstoffe, da so eventuell dieses in vielen humanen Tumoren mutierte Tumorsuppressorgenprodukt umgangen werden kann (Ongkeko et al., 1995). In funktionsfähigem Zustand (Wildtyp-p53) führt zum Beispiel ein Einzelstrangbruch in der DNA während der G₁-Phase zur Aktivierung des p53-Proteins. Dadurch wird entweder die Expression des CKIs p21^{Cip1/Waf1} (siehe auch Kapitel 2.4.1) induziert und es kommt zu einem Arrest im Zellzyklus bis der DNA-Schaden repariert werden kann, oder es wird Apoptose induziert (Hensler und Gautier, 1995). In beiden Fällen wird verhindert, daß ein DNA-Schaden an Tochterzellen weitergegeben wird.

Bestimmte apoptotische Ereignisse werden in keiner Weise von CDK-Inhibitoren beeinflusst, wie zum Beispiel die Myc-induzierte Apoptose, die gegenüber Roscovitin, p21^{Cip1} und p27^{Kip1} insensitiv ist (Rudolph, 1996).

2.4.3.6 Verwendung als molekulare Werkzeuge

Bislang wurden zur Untersuchung der Zellzyklusmaschinerie unter anderem die temperatursensitive CDK1-Mutanten-Mauszelllinie *tsFT210* (Th'ng et al., 1990) oder CDK-dominant-negative Mutanten (van den Heuvel und Harlow 1993; Meikrantz und Schlegel, 1996) verwendet oder Antikörper gegen CDKs mikroinjiziert (Riabowol et al., 1989) oder eine Überexpression von natürlichen Proteininhibitoren (Harper, 1996) erzwungen. Die oben beschriebenen Hemmwirkungen der nichtpeptidischen CDK-Inhibitoren machen sie zu interessanten Werkzeugen in der analytischen Biochemie, die diese Reihe von Untersuchungsmöglichkeiten erweitern.

Für viele Zellmodelle konnte die Reversibilität des von ihnen induzierten Arrests beobachtet werden, eine Voraussetzung für die Verwendung zum Synchronisieren von Zellpopulationen (Meijer, 1996). Hela-Zellpopulationen wurden mit Hilfe von Olomoucine in der Prophase angereichert, um den mitotischen Abbau des Golgi-Apparates zu untersuchen. Sie wurden dabei mit Aphidicolin vorsynchronisiert (Anreicherung in G₁/S), dann wurde das Aphidicolin ausgewaschen und die Zellen mit Olomoucine versetzt. Dies führte zu einer reversiblen Prophase-Arretierung. Durch erneutes Auswaschen wurden die Zellen dann aus der Arretierung entlassen (Misteli und Warren, 1995). BY-2-Tabakzellen wurden durch Roscovitin in der späten G₁-Phase reversibel arretiert. Durchlaufen die Zellen vor Zugabe von Roscovitin die S-Phase, so werden sie reversibel in der Prophase arretiert (Meijer, 1996).

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der CDK-Inhibitoren besteht in der affinitätschromatographischen Aufreinigung von CDKs aus zellulären Extrakten. Dazu müßten die Inhibitoren an ein Trägermaterial immobilisiert werden. Auf diese Weise können möglicherweise größere Mengen an Enzym, zum Beispiel für röntgenographische Untersuchungen oder für Screeningtests gewonnen werden (Meijer, 1996).

2.4.3.7 Verwendung als Therapeutika

Aufgrund ihrer Fähigkeit, Zellpopulationen im Zellzyklus zu arretieren, eröffnet sich für CDK-Inhibitoren prinzipiell ein weites Anwendungsfeld. Der Einsatz ist in allen Situationen denkbar, die durch unerwünschte Proliferation gekennzeichnet sind. Neben der Anwendung als Medikament bei verschiedenen Krankheiten (Krebs, Alzheimersche Krankheit, Psoriasis, Pilz- oder sonstiger Parasitenbefall) ist auch ein Einsatz als Herbizid denkbar. Im folgenden wird auf Befunde eingegangen, die einen Einsatz im Kampf gegen Krebs und die Alzheimersche Krankheit möglich erscheinen lassen.

2.4.3.7.1 Krebs

Die Entwicklung menschlicher Tumoren ist mit zahlreichen Anomalien der CDK-Proteine und ihrer Regulatoren verbunden. Ein Onkogenprodukt, das ursprünglich in einer B-Zell-Leukämie nachgewiesene Bcl-1, ist identisch mit dem humanen Cyclin D1 (Xiong et al., 1991). Es wurde im Komplex mit CDK2, CDK4 und CDK5 gefunden und aktiviert diese möglicherweise (Xiong et al., 1992). Es ist ferner an Brustkrebs und an Tumoren im Kopf- und Halsbereich beteiligt (Weinberg, 1995; Cordon-Cardo, 1995). In humanen Leberkrebszellen konnte Cyclin A als Onkogenprodukt identifiziert werden (Motokura und Arnold, 1993; Cordon-Cardo, 1995) Auch für Cyclin E und CDK4 wurden in menschlichen Tumoren Mutationen oder Fehlregulationen des jeweiligen Gens nachgewiesen (Weinberg, 1995; Cordon-Cardo, 1995). CDK4 wird zum Beispiel in Tumoren des zentralen Nervensystems überexprimiert (Reifenberger et al., 1994).

Es wurden Hinweise auf eine Beteiligung des Enzymkomplexes CDK1/Cyclin B an malignen Tumorerkrankungen gefunden. So aktiviert CDK1 wahrscheinlich das Onkogenprodukt Src, eine Serin-Threonin-Kinase (Chackalaparampil und Shalloway, 1988; Morgan et al., 1989; Shenoy et al., 1989), deren vermehrte Aktivität man in Colontumoren (Cartwright et al., 1990; Garcia et al., 1991) und Hauttumoren (Barnekow et al., 1987) findet. Die CDK1 ist in humanen Magenkrebs- und Dickdarmkrebszelllinien überexprimiert (Yasui et al., 1993). In Epithelzellen der Brust korreliert der Gehalt an Cyclin B- und CDK1 mit der Malignität. Höchstwerte werden bei invasiven Karzinomen gefunden (Kawamoto et al., 1997). Der Gehalt an CDK1 scheint auch mit dem Stadium der Dedifferenzierung bzw. Malignität in der Mehrzahl der Prostata-Adenokarzinome zu korrelieren (Kallakury et al., 1997). In humanem Brustkrebsgewebe wurde eine Variante der CDK1 entdeckt, deren biologische Funktion bislang unklar ist. Die mutierte CDK1 wurde in 10 von 14 Gewebeproben nachgewiesen und ist im Vergleich zur normalen Form um 57 Aminosäuren verkürzt, wodurch fast der gesamte Bereich des sogenannten *T-Loops* (incl. Thr161) fehlt. Es findet weder mit Cyclin B noch mit p21 eine Bindung statt, und der Mutanten fehlt die Fähigkeit, Histon H1 zu phosphorylieren (Ohta et al., 1998).

Inhibitoren cyclinabhängiger Kinasen CKIs werden als Tumorsuppressorgenprodukte diskutiert. In einigen Tumoren wurden p16^{INK4B}-resistente CDK4-Mutanten gefunden (Marx, 1994). Das Gen für den CKI p21^{Cip1}, *cip1* wurde als ein Ziel-Gen des Produkts des Tumorsuppressorgens p53 identifiziert (Motokura und Arnold, 1993). Durch eine Überexpression von p21^{Cip1} oder von p16^{INK4B} *in vitro* oder von p21^{Cip1} *in vivo* kann Proliferation unterdrückt werden (Meijer, 1996).

Der CDK-Inhibitor Flavopiridol befindet sich bereits in klinischer Prüfung (siehe Kapitel 2.4.3.2).

2.4.3.7.2 Alzheimerische Krankheit

Die Gehirne von Patienten der Alzheimerischen Krankheit (AD) enthalten zwei auffällige Arten von Ablagerungen: Amyloidplaques und Neurofibrillenbündel (engl.: *neurofibrillary tangles*, NFTs). Amyloidplaques bestehen aus Aggregaten eines Peptids, das sich von einem Transmembranprotein, dem sogenannten *amyloid precursor protein* (APP) ableitet und durch anomale Proteolyse entsteht. NFTs und ihre Bestandteile, die sogenannten *paired helical filaments* (PHF), hyperphosphorylierte proteinartige Aggregate, bestehen zum größten Teil aus dem mikrotubuliassoziierten Tau-Protein, das ungewöhnliche Phosphorylierungen aufweist. Einem deutlichen Verlust von Nervenzellen bei der AD geht oft eine Ansammlung von NFTs voran (Vincent et al. 1997). Diese Ablagerungen sind daher besonders dazu geeignet, den Grad der Alzheimerischen Krankheit zu beurteilen, da die Anzahl und die Lokalisation der neurofibrillären Änderungen in einer engen Beziehung zur Schwere der Krankheit stehen (Mandelkow und Mandelkow, 1993; Vincent et al., 1997).

Obwohl die Beziehung zwischen der anomalen Tau-Phosphorylierung und der Alzheimerischen Krankheit noch unklar ist, konnten viele der Phosphorylierungsstellen des Tau-Proteins identifiziert werden (Morishima-Kawashima et al., 1995 a und b). Bei einigen Phosphorylierungsstellen des Tau-Proteins konnte gezeigt werden, daß die Phosphorylierung durch den Enzymkomplex CDK5/p35 zustande kommt (Lew und Wang, 1995). Auch eine Überexpression von CDK1 scheint bei der Phosphorylierung des Tau-Proteins von Bedeutung zu sein. Es wird *in vitro* von CDK1 und MAP2-Kinase phosphoryliert. Die Phosphorylierung reduziert drastisch die Interaktion mit dem Tau-1-Antikörper, wie es auch für Tau-Protein bei Alzheimer-Patienten beschrieben wurde. Sowohl MAP2-Kinase als auch CDK1 kommen in Gehirnextrakten von Alzheimer-Patienten in höheren Konzentrationen vor als in gesunden Gehirnen (Ledesma et al., 1992). In PHFs von Alzheimer-Patienten konnte mit Antikörpern gegen CDK1 ein Protein markiert werden, das in NFTs in Neuronen von Alzheimer-Patienten vorkommt und mit den PHFs vergesellschaftet ist (Liu et al., 1995; Vincent et al., 1997). Mit einem Antikörper gegen CDK5 gelang dagegen keine Markierung der NFTs (Liu et al., 1995), und in normalen Neuronen konnte auf diese Weise kein aktives CDK1 nachgewiesen werden (Vincent et al., 1997). PHF-Präparationen enthalten Kinaseaktivität für Histon H1 (Liu et al., 1995; Vincent et al., 1997). Bestimmte anomale Phosphorylierungen im Tau-Protein sind Prolin-gerichtet (Morishima-Kawashima et al., 1995a), das heißt neben dem Serin oder Threonin, das phosphoryliert wird, befindet sich in der Aminosäuresequenz Prolin. Wie oben (Kapitel 2.4.2) beschrieben scheint für CDK 1 in der Konsensussequenz für die Phosphorylierung ein Prolin direkt nach Serin essentiell zu sein (Zhang et al., 1994). In rekombinantem Tau-Protein werden *in vitro* bestimmte, Prolin-gerichtete Phosphorylierungen von dem Enzymkomplex CDK1/Cyclin B erzeugt aber nicht von anderen Prolin-gerichteten Kinasen. Diese Ergebnisse legen nahe, daß die anomale Expression des CDK1/Cyclin B-Komplexes in NFT-Neuronen in Gehirnen von Patienten der Alzheimerischen Krankheit zu den Phosphoepitopen beiträgt (Vincent et al., 1997).

2.5 Cyclovoltammetrie

Die Cyclovoltammetrie hat sich in den 70er und 80er Jahren zu einer effizienten Methode zur Charakterisierung der Mechanismen von Elektronentransferreaktionen entwickelt. Der Anwendungsbereich erstreckt sich von der Untersuchung einfacher Redoxvorgänge bis zur Charakterisierung von Multielektronentransferprozessen in der Biochemie oder der makromolekularen Chemie. Das Cyclovoltammogramm gibt hierbei nicht nur Einblick in thermodynamische Parameter wie das Redoxpotential, sondern auch unmittelbar in die Kinetik von Elektrodenreaktionen, die sowohl die Elektronentransferschritte als auch angekoppelte chemische Reaktionen umfassen. Ein großer Vorteil der Cyclovoltammetrie gegenüber den meisten anderen elektroanalytischen Methoden ist, daß Zwischenstufen der elektrochemischen Reaktion nachgewiesen werden können.

Im üblichen cyclovoltammetrischen Experiment wird eine stationäre Arbeitselektrode verwendet, die in einem ruhenden Elektrolyten eintaucht. An diese Elektrode wird ausgehend von einem Ausgangspotential E_i ein sich zeitlich linear änderndes Potential angelegt. Bei Erreichen eines bestimmten, dem jeweiligen Experiment angepassten Werts wird das Potential, wiederum zeitlich linear, zurückgeführt. Die sogenannte Vorschubgeschwindigkeit bewegt sich meist im Bereich von 5 mV/s bis 1 V/s. Das Arbeitselektrodenpotential ist dabei immer auf eine nicht polarisierte Referenzelektrode bezogen, zum Beispiel auf die gesättigte Kalomelektrode (SCE, *saturated calomel electrode*). Durch Zugabe eines Leitsalzes ($c \approx 0,1M$) zur Elektrolytlösung wird zum einen die Sicherung der Leitfähigkeit erreicht, zum anderen wird die Ausbildung von Migrationsströmungen verhindert, und der Massentransport der elektroaktiven Spezies, die an der Elektrode reduziert oder oxidiert wird, kann ausschließlich durch Diffusion erfolgen. Beim Leitsalz handelt es sich neben Alkalimetallsalzen (für wäßrige Lösungen) vor allem um Tetraalkylammoniumsalze, die auch in aprotischen Lösungen verwendbar sind und sich zum Teil wie Tetra-*n*-butylammoniumhexafluorophosphat durch sehr hohe Zersetzungsspannungen auszeichnen. Wenn das Standardpotential eines in der Elektrolytlösung vorgelegten elektroaktiven Systems innerhalb des voltammetrisch erfaßten Potentialbereichs liegt, fließt über die Elektrode ein Strom. Die aufgezeichnete Strom-Spannungskurve ist das Cyclovoltammogramm (Heinze, 1984; Speiser, 1981; Evans, 1977 und Fry, 1972).

2.6 Interkalation in die DNA

Von Interkalation (von lat.: *intercalare*, "einschieben") spricht man, wenn sich bestimmte Moleküle, die vollständig oder teilweise planar sind, in die Doppelhelix der DNA zwischen benachbarte Basenpaare einschieben. Durch die Einlagerung wird die Replikation und Transkription der DNA gestört. Die Interkalation wird deshalb für die mutagene Wirkung vieler Vertreter dieser Stoffklasse verantwortlich gemacht, und auch die chemotherapeutische Wirkung von Antibiotika bzw. Zytostatika wie

Actinomycin oder Daunorubicin wird unter anderem auf die Interkalation zurückgeführt. Zu den Verbindungen mit interkalativen Eigenschaften gehören neben den erwähnten Zytostatika zum Beispiel auch polyaromatische Kohlenwasserstoffe sowie Farbstoffe des Ethidiumbromidtyps oder des Proflavintyps (Falbe und Regitz, 1992; Mutschler 1996). Für Indirubin wurde eine nichtkovalente Bindung an Kalbsthymus-DNA beschrieben (vgl. Kapitel 2.1.4.3). Dabei könnte es sich durchaus um Interkalation handeln, da das UV-Spektrum durch die Indirubin-DNA-Wechselwirkung beeinflusst wurde und die Bindung durch Zugabe von 8 M Harnstofflösung stark abnahm (Wu et al., 1982), ein Effekt, der wegen der denaturierenden Eigenschaft von wäßrigen Harnstofflösungen auf Nucleinsäuren im Falle einer Interkalation zu erwarten ist.

2.7 Colony-Forming-Assay

Die Entwicklung eines neuen potentiell antineoplastischen Wirkstoffs erreicht irgendwann den Punkt, an dem geklärt werden muß, in wieweit die Übertragbarkeit der erzielten *in vitro*-Ergebnisse auf den Menschen gegeben ist. Noch in jüngerer Vergangenheit wurden neue Substanzen in erster Linie an Ratten- oder Mäuse-Tumormodellen einer Reihenuntersuchung (*Screening*) unterzogen (Fiebig und Berger, 1992), ungeachtet der Tatsache, daß aufgrund unterschiedlicher enzymatischer Ausstattung die Übertragbarkeit auf den Menschen nicht unbedingt gewährleistet ist. Oft entschied sich auch nur an einer einzigen oder an wenigen Tumorarten die Vorauswahl der weiter zu untersuchenden Substanzen. Auf dieser Stufe der Entwicklung eines potentiell neuen Medikaments konnte es durchaus vorkommen, daß Stoffe, die später am Menschen an bestimmten Tumoren hätten wirksam sein können, vorzeitig aussortiert wurden. Deswegen stellen präklinische Untersuchungen potentieller antineoplastischer Wirkstoffe an humanen Tumormodellen demgegenüber eine entscheidende Verbesserung dar. Benutzt man Tumormaterial, das direkt aus Menschen stammt, ergeben sich jedoch Nachteile, wie zum Beispiel geringe Wachstumsraten der Zellkulturen, oder daß das Tumormaterial nicht unbegrenzt zur Verfügung steht und deswegen Ergebnisse nicht reproduziert werden können oder nicht vergleichbar sind. Um diese Einschränkungen zu umgehen, werden für den Colony-Forming-Assay humane Tumoren in Nacktmäusen kultiviert. Dazu werden aus chirurgisch entnommenen humanen Tumoren Einzelzellsuspensionen hergestellt. Durch meist dorsale Implantation in immundefiziente Nacktmäuse können im Idealfall solide Tumoren, sogenannte Xenografts erzeugt werden. Humanes Tumormaterial wird dadurch in großen Mengen zugänglich und die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen kann überprüft werden (Fiebig und Berger 1992). Zudem ist eine gute Übertragbarkeit der *in vitro* erhaltenen Colony-Forming-Assay-Ergebnisse auf die *in vivo*-Aktivität in Nacktmäusen, in die der entsprechende Xenograft eingepflanzt worden ist, gegeben (Berger et al., 1990). Werden nur *in vitro*-vorausgewählte Tumoren für eine gegebene Testsubstanz *in vivo* weiteruntersucht, reduziert dieser Ansatz außerdem die Anzahl der Tiere, die für Experimente zur Neuentwicklung von antineoplastischen Medikamenten nötig sind (Fiebig und Berger 1992; Berger et al. 1990). Im Falle von soliden Tumoren kann der Colo-

ny-Forming-Assay darüber hinaus Voraussagen liefern, ob der Tumor eines Krebspatienten auf die Behandlung mit einem gegebenen antiproliferativem Medikament anspricht oder ob eine Resistenz vorliegt (Scholz et al., 1990; von Hoff, 1988). Auch in den USA wurde das in den Jahren 1985 bis 1990 durchgeführte Screening an der Leukämiezelllinie P388 in Mäusen und Ratten zugunsten eines neuen *in vitro*-Testsystems, basierend auf einer größeren Anzahl verschiedener humaner Tumorzelllinien, des sogenannten *NCI-panels* aufgegeben (Boyd und Paull, 1995).

2.8 Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient

Zahlreiche Beobachtungen führten bereits Ende des 19. Jahrhunderts zu der Vermutung, daß zwischen der Lipophilie eines Stoffes und seiner biologischen Wirksamkeit ein Zusammenhang besteht. Es kam seitdem zu mehreren Versuchen, diesen Effekt zu quantifizieren. Hammett formulierte in den dreißiger Jahren eine Gleichung, die eine Beziehung zwischen der Reaktivität eines aromatischen Systems und den elektronischen Eigenschaften dessen Substituenten herstellt. Eine Weiterentwicklung führte letztlich zu quantitativen Struktur-Wirkungsanalysen (engl.: *quantitative structure activity relationship*, QSAR). Bei der sogenannten Hansch-Analyse werden *n*-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten, P_{OW} (P von engl. *partition*, "Verteilung") bestimmt. Man fand unter anderem, daß sich die Logarithmen dieser Koeffizienten als Summe der Gruppenbeiträge einzelner Teile des Moleküls angeben lassen und daß die Lipophilie mit der biologischen Wirkung korreliert.

Die Abhängigkeit der biologischen Wirkung von der Lipophilie eines Stoffes wird verständlich, wenn man in Betracht zieht, daß biologische Systeme zum größten Teil aus wäßrigen Phasen bestehen, die durch lipophile Membranen getrennt sind. Der Transport und die Verteilung müssen also von der Lipophilie abhängen. Nur Stoffe mittlerer Lipophilie haben eine Chance in größerem Umfang zu wandern, da die anderen jeweils um so eher in der Umgebung verbleiben, in der sie besser löslich sind, je extremer ihre hydrophile oder lipophile Eigenschaften sind. Nur Stoffe mittlerer Lipophilie haben so die Möglichkeit in ausreichender Konzentration an ihren Wirkort zu gelangen.

n-Octanol wurde als lipophiles Medium aus verschiedenen Gründen gewählt. In seiner Struktur, bestehend aus der langen aliphatischen Kette und der Hydroxygruppe, die sowohl Wasserstoffbrückenbindungsdonor als auch Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor sein kann, ist eine Ähnlichkeit zu Membranlipiden vorhanden. Außerdem löst *n*-Octanol eine große Zahl organischer Verbindungen und ist über einen weiten Bereich für UV-Strahlung durchlässig. Letzteres war besonders zu Beginn der Untersuchungen, als HPLC-Methoden noch nicht in dem Maße wie heute zur Verfügung standen, von entscheidender Bedeutung für die Gehaltsbestimmung in der Octanolphase (Böhm et al., 1996).

Der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (P_{OW}) ist der Quotient aus der Konzentration des Stoffes in der *n*-Octanol-Phase und der Konzentration in der wäßrigen Phase. Angegeben wird häufig der de-

kadische Logarithmus ($\log P_{OW}$). Substanzen mit negativem $\log P_{OW}$ lösen sich in Wasser besser als in *n*-Octanol. Dazu gehören Salze oder polare Moleküle, wie zum Beispiel Aceton mit einem $\log P_{OW}$ von -1,10 (Unger et al., 1978). Substanzen, die in lipophilen und hydrophilen Medien eine in etwa gleich gute Löslichkeit aufweisen, bewegen sich mit ihrem $\log P_{OW}$ um null. So hat zum Beispiel Brenzcatechin (Benzol-1,2-diol) einen $\log P_{OW}$ von 0,00, Pyridin ist mit einem $\log P_{OW}$ von 0,30 in *n*-Octanol etwas besser löslich als in der wäßrigen Phase (Unger et al., 1978). Viele Phenol- und Anilinderivate bewegen sich bei $\text{pH} = 7$ in einem $\log P_{OW}$ -Bereich zwischen 1 und 2 (Carlson et al., 1975). Die Werte von als typisch lipophil geltenden Substanzen beginnen etwa ab einem $\log P_{OW}$ von 2,5. Trichlorethen ($\log P_{OW} = 3,07$) und 1,1,1-Trichlorethan ($\log P_{OW} = 2,47$) (Falbe und Regitz, 1992) sind Beispiele für bereits deutlich lipophile Substanzen. Auch Indol mit einem $\log P_{OW}$ von 2,25 (Rogers und Cammarata, 1969) oder Toluol mit einem $\log P_{OW}$ von 2,69 (McCall, 1975) liegen in diesem Bereich. Höhere $\log P_{OW}$ -Werte treten zum Beispiel bei *p,p'*-DDE (5,76) und *p,p'*-DDT (6,33) auf (Geyer et al., 1986). Eine noch stärkere Lipophilie und damit noch größere $\log P_{OW}$ -Werte werden von der Gruppe der polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe erreicht, die einen Bereich von 3 bis 8 umfassen (Falbe und Regitz, 1992). Bei protisch-polaren oder protonierbaren Verbindungen hat der pH-Wert entscheidenden Einfluß auf den Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten.

3 Problemstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, bekannte und neue Bisindolderivate zu synthetisieren und Indizien für den Wirkmechanismus der antineoplastischen Wirkung indigoider Bisindole zu finden. Ein Schwerpunkt soll auf in 5-Position substituierten und in 3'-Stellung eine Oximfunktion tragenden Indirubinderivaten liegen, da diese Modifikationen die antineoplastische Wirkung der Substanzklasse zu verstärken scheint. Kommerziell erhältliche Indigoderivate sollen die Anzahl der zu den folgenden Untersuchungen zur Verfügung stehenden Bisindole erhöhen.

Mit der Methode der Cyclovoltammetrie soll die Möglichkeit untersucht werden, ob die Stoffgruppe der Indirubine reduktiv oder oxidativ aktiviert werden kann. In einem Interkalationsassay soll überprüft werden, ob die synthetisierten Derivate eine nichtkovalente Wechselwirkung mit der DNA eingehen.

Voruntersuchungen lieferten Hinweise auf eine Beeinflussung von Enzymen des Zellzyklus durch Indirubin. Die Verbindungen sollen deswegen auf ihre Hemmwirkung auf den Enzymkomplex CDK1/Cyclin B untersucht werden. Aus ersten Ergebnissen sollen besser wirksame Strukturen abgeleitet werden.

Mittels Colony-Forming-Assay und Sulforhodamin B-Test soll die wachstumshemmende Wirkung an Tumorzellen untersucht werden. Im Falle positiver Ergebnisse sollen erste *in vivo*-Versuche an thymusaplastischen Nacktmäusen folgen.

Die Lipophilie der Substanzen soll über die Verteilung im System Octanol/Wasser bestimmt werden. Falls sie mit den Daten der Wachstumshemmung korreliert, soll der Bereich des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten bestimmt werden, für den eine optimale Wirkung erwartet werden kann.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Synthese der Isatin- und Indirubinderivate

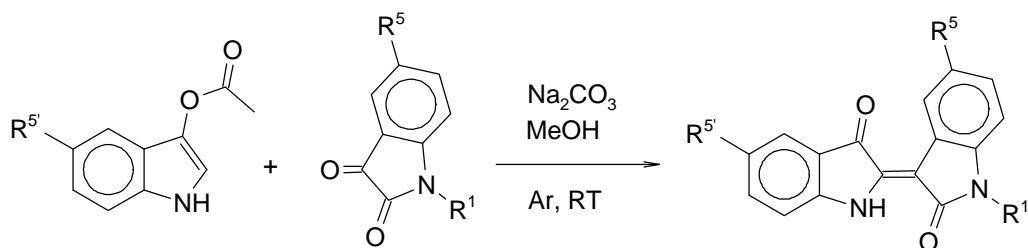


Abb. 27: Syntheschema zu den Indirubinderivaten

Zur Synthese der Indirubinderivate wird jeweils das entsprechend substituierte Isatinderivat mit dem entsprechend substituierten Indoxylacetatderivat unter Schutzgas und alkalischen Bedingungen (Natriumcarbonat) in methanolischer Lösung kondensiert.

Der Reaktionsmechanismus verläuft analog einer Aldol-Kondensation und ist in **Abb. 28** erläutert. Die Reaktion läuft in feuchtem Methanol ab, so daß als angreifendes Teilchen das Hydroxid-Ion betrachtet werden muß. Es hydrolysiert die Esterbindung des Indoxylacetats. Das entstehende Indoxylat-Anion greift Isatin an der 3-Carbonylgruppe an, und die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung bildet sich. Nach Aufnahme eines Protons eliminiert das entstehende Zwischenprodukt Wasser und es bildet sich Indirubin.

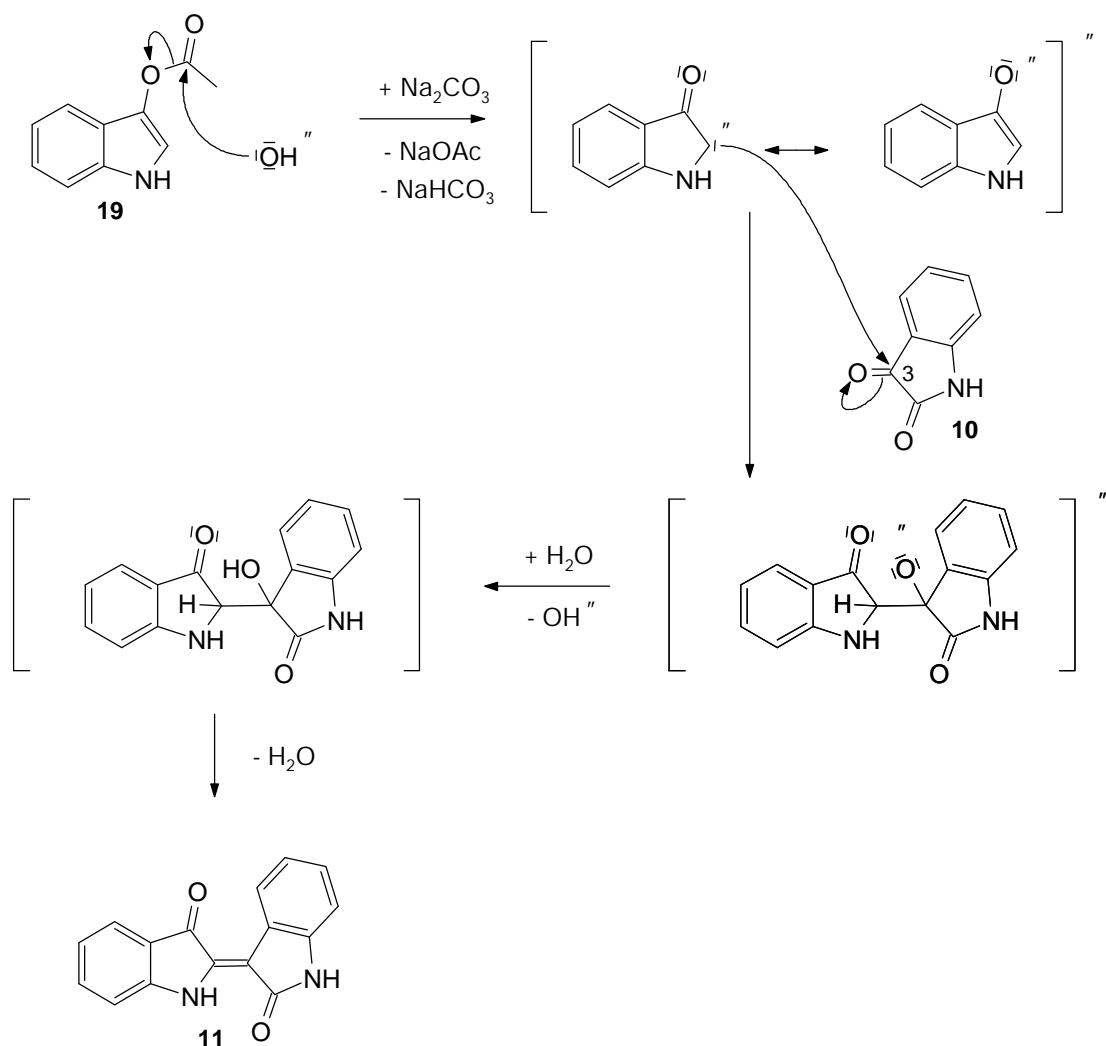


Abb. 28: Reaktionsmechanismus der Bildung von Indirubin

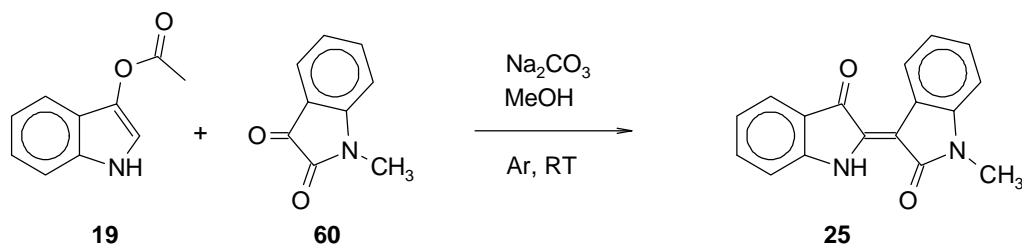
Dabei wird das Isatinderivat im Überschuß (etwa 10 mol-%) zugegeben, um einer Indigobildung vorzubeugen. Nach halbstündiger, heftiger Durchmischung wird die Suspension für 24 Stunden bei Raumtemperatur unter Schutzgas stehen gelassen und danach das Rohprodukt durch Absaugen durch eine Glasfritte isoliert. Das Syntheseprinzip wird dabei von Russell und Kaupp (1969) übernommen. Die vorgeschlagene Aufbereitung durch kontinuierliche Extraktion mit Ethanol in einer Soxhlet-Apparatur ist jedoch wegen der schlechten Löslichkeit der meisten Produkte nicht zufriedenstellend (Hössel, 1995). Die verschiedenen Aufarbeitungsarten sowie die NMR-Daten sind im folgenden beschrieben. Die Zuordnung der Signale wird unter Zuhilfenahme von Inkrementabschätzungen anhand der NMR-Spektren von unsubstituiertem Indirubin und 5-Iodindirubin vorgenommen.

Im Anhang (Kapitel 8.1) sind die NMR-Spektren von Indirubin und 5-Iodindirubin angegeben. Im ^{13}C -NMR-Spektrum von Indirubin wurden bislang die beiden Signale bei 121,65 ppm und 113,42 ppm den Kohlenstoffatomen $\text{C}5'$ und $\text{C}7'$ zugeordnet, ohne daß eine Unterscheidung getroffen werden konnte, welches Signal welchem C-Atom zuzuordnen ist (Hössel, 1995). Durch die Analyse der ^{13}C -NMR-Spektren von 5'-Bromindirubin (67) (siehe Kapitel 4.1.8) konnte nun eine eindeutige Zuord-

nung getroffen werden: C5' tritt bei 121,65 ppm in Resonanz und C7' bei 113,42 ppm. Außerdem muß die Zuordnung der Signale zu C7a und C7a' umgekehrt werden, wie sich aus Analyse der ^{13}C -NMR-Spektren von 5-Bromindirubin (**31**) (siehe Kapitel 4.1.3) und 5'-Bromindirubin (siehe Kapitel 4.1.8) ergeben hat. Die Zuordnung der Signale zu C3a und C3a' hat sich durch die $^3J_{\text{F,H}}$ -Kopplung zwischen dem Fluoratom und C3a im Spektrum von 5-Fluorindirubin (**62**) (siehe Kapitel 4.1.5) bestätigt. Die Zuordnung der Signale in den ^{13}C -NMR-Spektren der Indirubinderivate kann nun in den meisten Fällen vollständig erfolgen.

Inkrementabschätzungen bei der Analyse der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren erfolgten soweit möglich nach eigenen Messungen und Berechnungen am Indirubinsystem oder am Isatinsystem, ansonsten unter Verwendung der Literaturwerte an Benzol (Hesse et al., 1987) oder an Isatin (Morales-Ríos und Joseph-Nathan, 1991).

4.1.1 1-Methylindirubin (**25**)



1-Methylindirubin (**25**) wird aus 1-Methylisatin (**60**) und Indoxylacetat synthetisiert. Das nach dem Waschen und Trocknen anfallende violette Pulver wird aus Pyridin umkristallisiert, getrocknet und sublimiert. Es entsteht in guter Ausbeute in Form violetter Substanzflocken geringer Dichte.

Fast alle Signale im ^1H -NMR-Spektrum sind im Vergleich zum Spektrum von unsubstituiertem Indirubin geringfügig tieffeldverschoben.

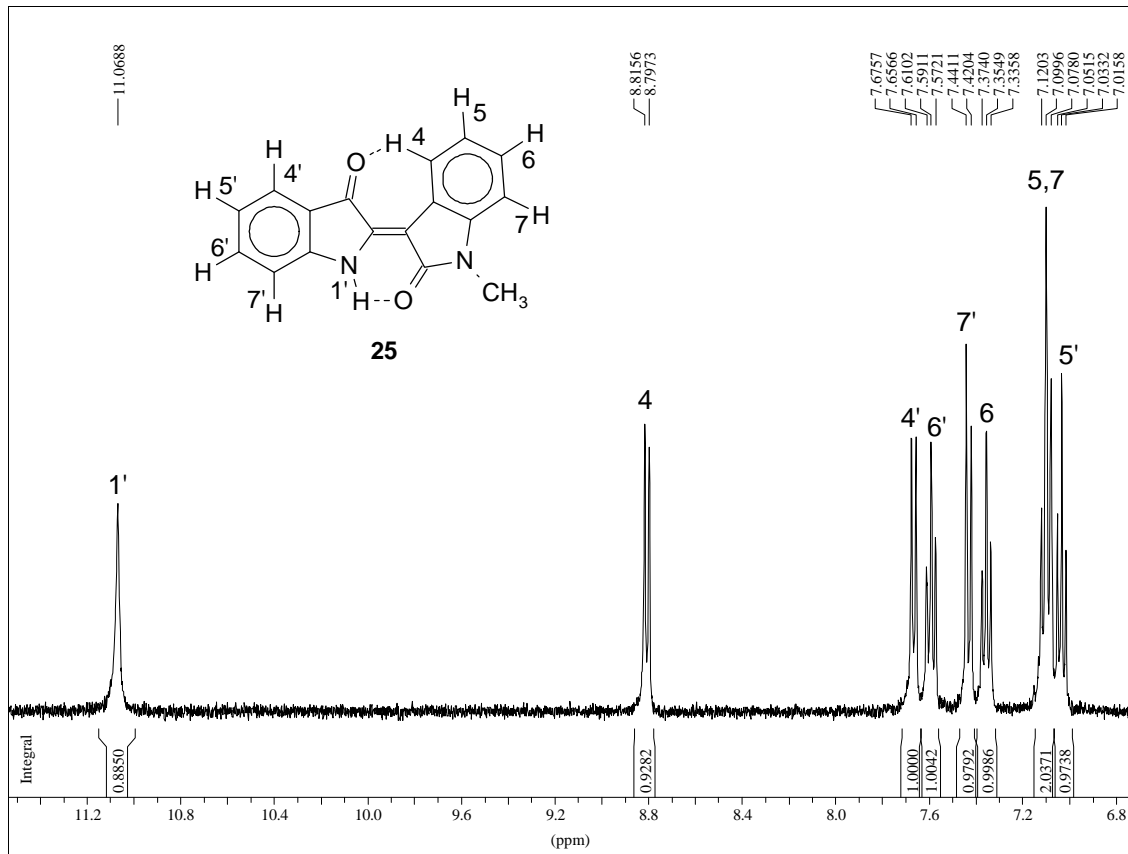


Abb. 29: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **25**, aromatischer Bereich und NH-Resonanz.

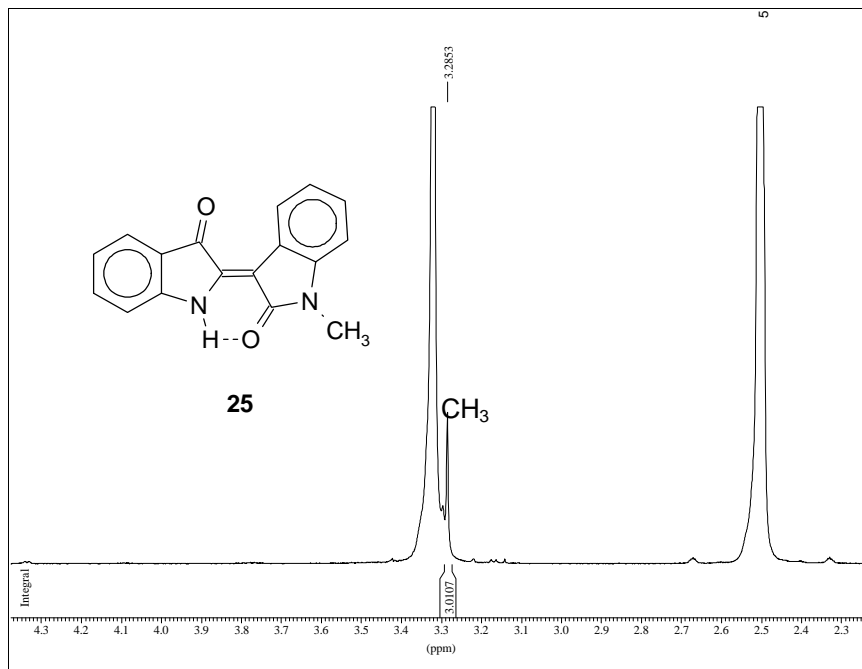


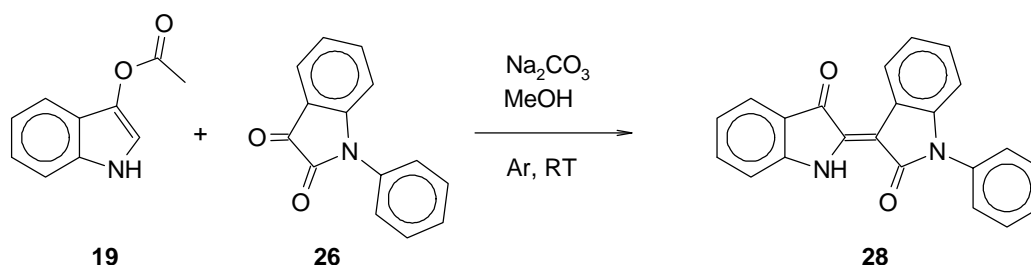
Abb. 30: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **25**, Bereich um das Methylsignal.

Tab. 5: Signallage und Kopplungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **25**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|------------------|
| 11,07 | s | N1'H |
| 8,81 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,3$ Hz | C4'H |
| 7,67 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,6$ Hz | C4'H |
| 7,59 | pt | C6'H |
| 7,43 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,3$ Hz | C7'H |
| 7,35 | pt | C6'H |
| 7,12 - 7,02 | m | C5'H, C7'H, C5'H |
| 3,29 | s | CH_3 |

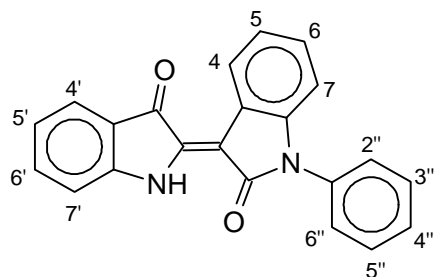
Aufgrund der schlechten Löslichkeit konnte kein $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum aufgenommen werden.

4.1.2 1-Phenylindirubin (**28**)



1-Phenylindirubin (**28**) wird aus 1-Phenylisatin (**26**) und Indoxylacetat synthetisiert und fällt nach dem Waschen und Trocknen in sehr guter Ausbeute als violettes Pulver an, das nicht weiter aufgereinigt werden muß.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigen die Signale des Indirubinsystems in ihrer Lage kaum Unterschiede zum unsubstituierten Indirubin. Die Dubletts weisen jeweils ein Integral von 1H auf, daher kann keines davon von den Protonen an C2''/C6'' des Phenylsubstituenten stammen, da in diesem Fall ein Integral von 2H vorliegen müßte. Die fünf Protonen des Phenylsubstituenten kommen in zwei Multipletts um 7,55 ppm zur Resonanz und überlagern mit dem Signal von C6'H.

**Abb. 31:** Numerierung von 1-Phenylindirubin (**28**)

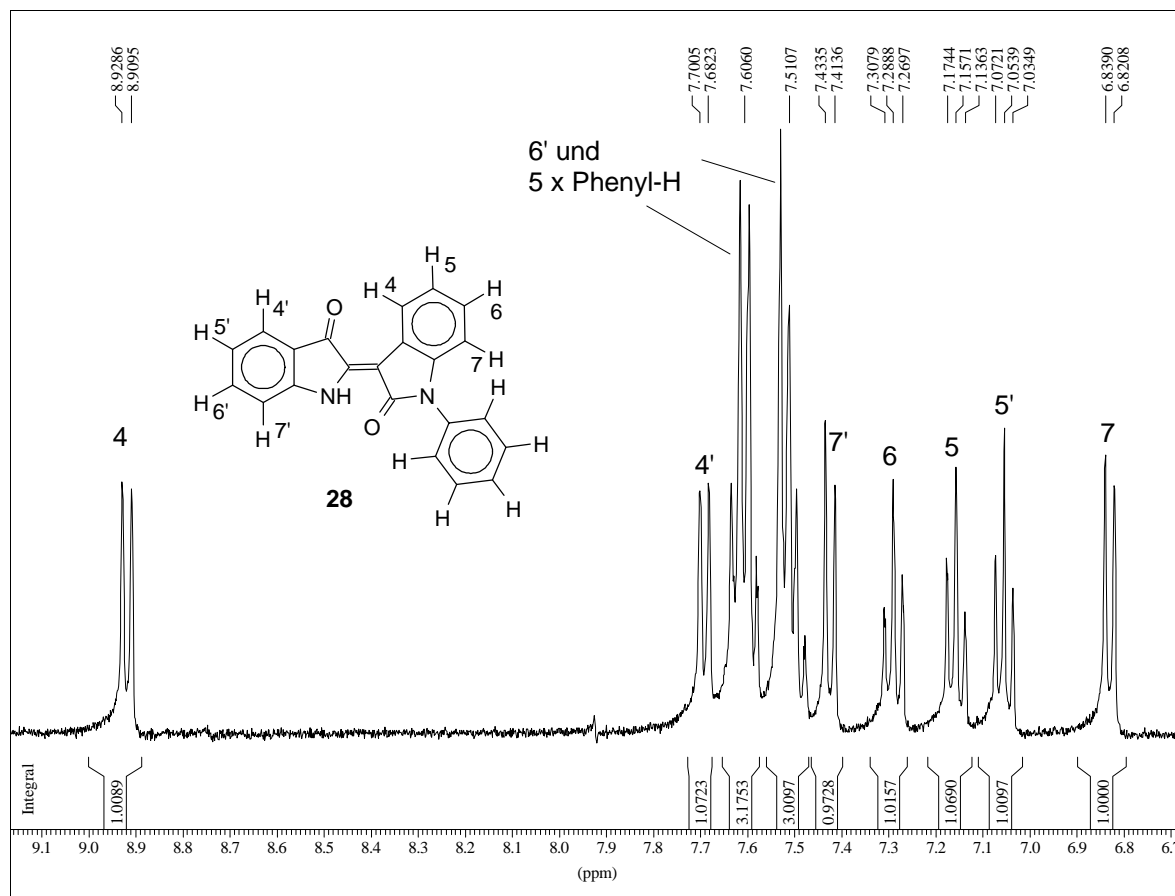


Abb. 32: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **28**, Bereich von 9,1 - 6,7 ppm.

Tab. 6: Signallage und Kopplungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **28**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 11,17 | s | N1'H |
| 8,92 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,6$ Hz | C4H |
| 7,69 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,3$ Hz | C4'H |
| 7,64 - 7,58 und 7,53 - 7,48 | m m | C6'H und 5 x Phenyl-H |
| 7,42 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,0$ Hz | C7'H |
| 7,29 | pt | C6H |
| 7,16 | pt | C5H |
| 7,05 | pt | C5'H |
| 6,83 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,3$ Hz | C7H |

Im $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum sind die Signale des Indirubinsystems im Vergleich zum unsubstituierten Indirubin kaum verändert. Lediglich C2 und C3 erfahren minimale Hochfeldshifts von -2,75 ppm bzw. -2,01 ppm. Deutlich unterscheidbar von allen anderen sind die Signale der Kohlenstoffatome C2''/C6'' und C3''/C5'' des Phenylsubstituenten, die jeweils identische chemische Umgebung haben und deshalb erhöhte Intensität aufweisen. Die Signale von C6 und C4' liegen so nahe beieinander, daß deren Kopplungskonstanten wegen Überlagerung nicht bestimmbar sind.

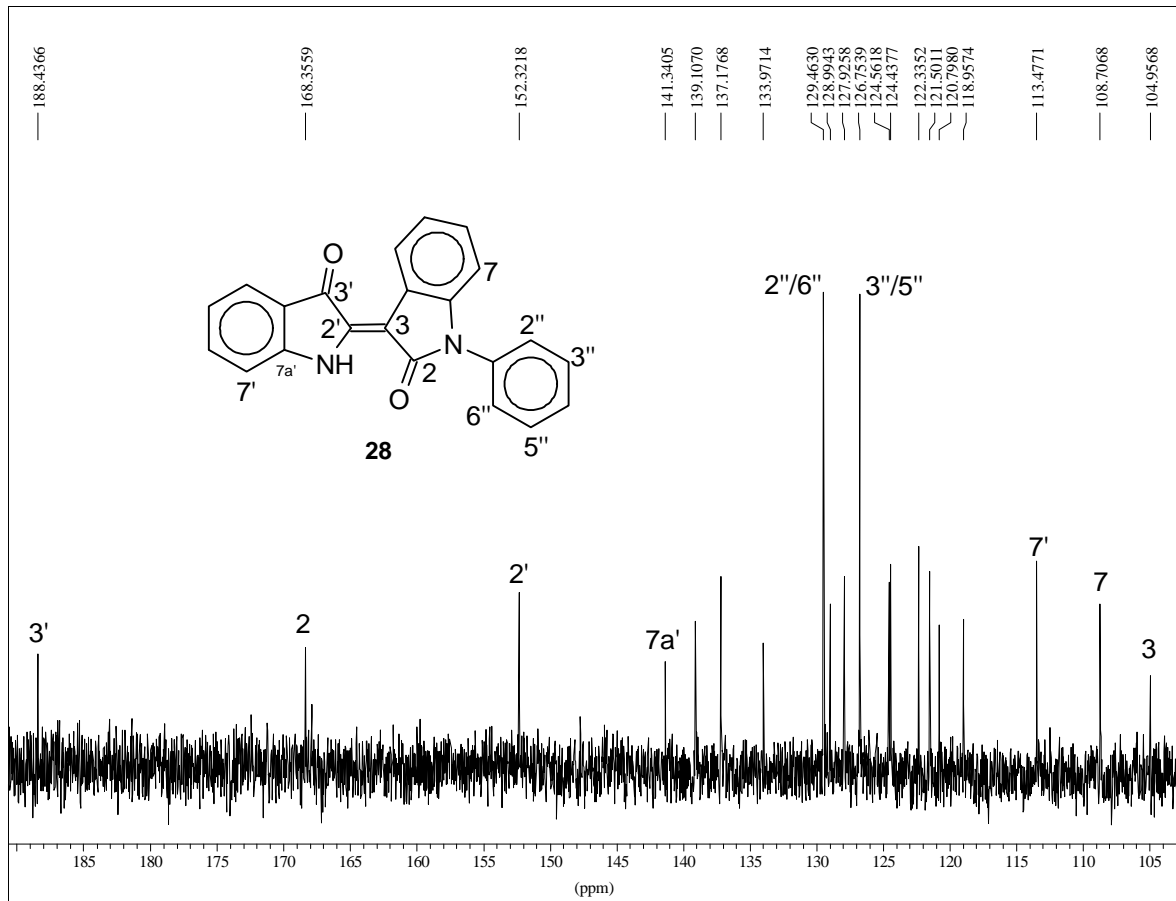


Abb. 33: ^1H -breitbandentkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum von **28**; die eindeutig zuordenbaren Peaks sind mit den entsprechenden Ziffern gekennzeichnet.

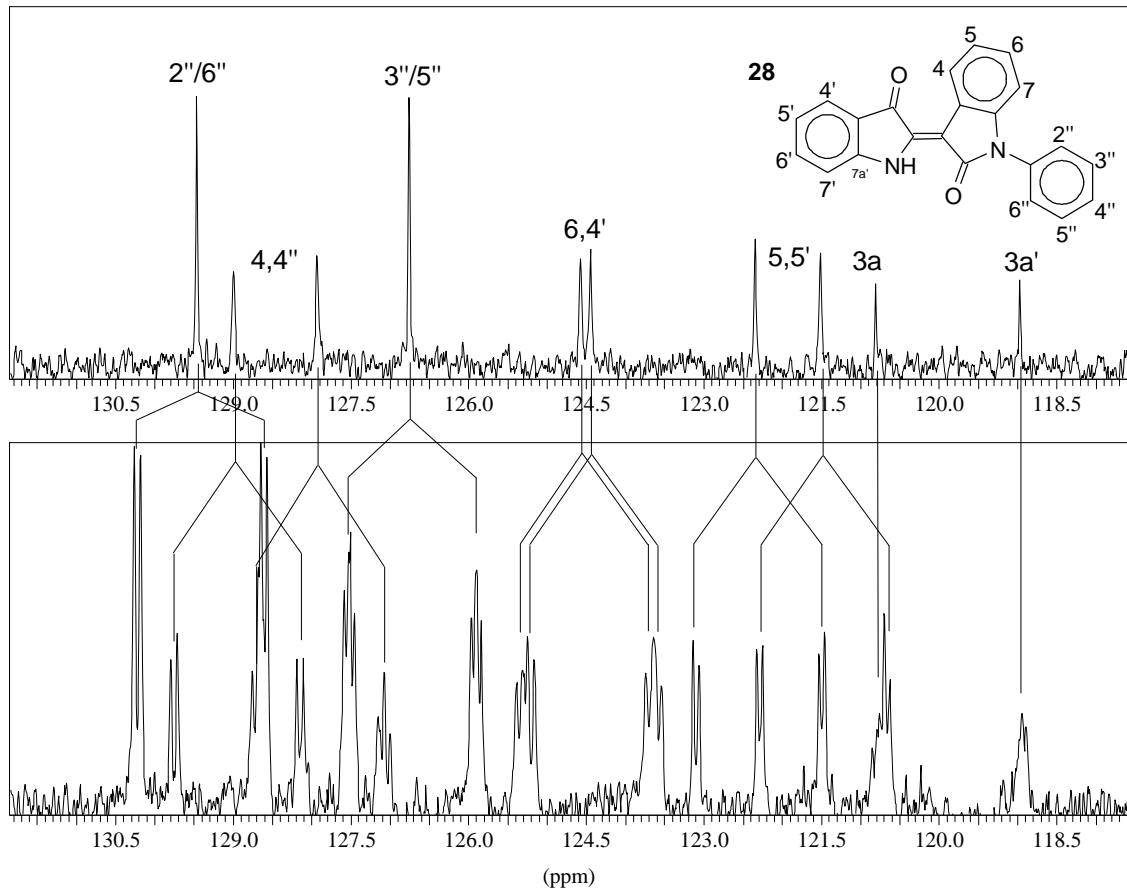


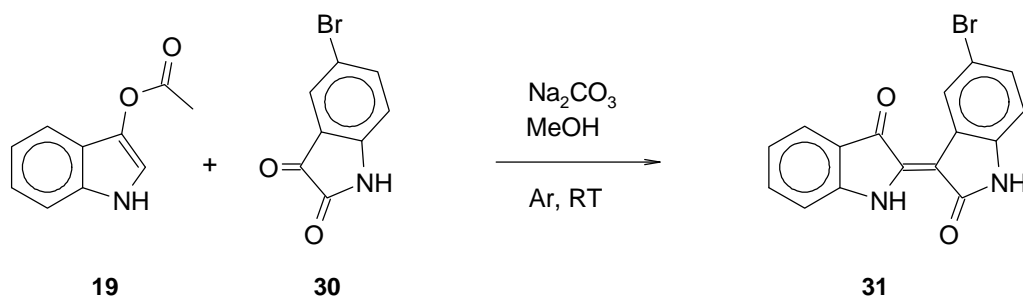
Abb. 34: ^{13}C -NMR-Spektrum von **28**, Bereich der schwer zuordenbaren Signale, oben protonenbreitbandenkopplung, unten: protonengekoppelt.

Tab. 7: Signallage und Kopplungen im ^{13}C -NMR-Spektrum von **28**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-------------------------|---|-------------------|
| 188,44 | s | C3' |
| 168,36 | s | C2 |
| 152,32 | s | C2' |
| 141,34 | s | C7a |
| 137,18 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 161,6$ Hz | C6' |
| 139,11 und 133,97 | 2 s | C7a', C1'' |
| 129,46 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 161,5$ Hz | C2'', C6'' |
| 128,99 und 127,93 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 160,8$ Hz | C4 und C4'' |
| 126,75 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 161,5$ Hz | C3'', C5'' |
| 124,56 und 124,44 | 2 d ¹⁾ | C6, C4' |
| 122,34 und 121,50 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 160,8$ d, $^1J_{\text{C,H}} = 159,1$ Hz | C5 und C5' |
| 120,80 | s | C3a |
| 118,96 | s | C3a' |
| 113,48 | s | C7' |
| 108,71 | s | C7 |
| 104,96 | s | C3 |

¹⁾Kopplungskonstanten aufgrund von Überlagerung der Signale nicht bestimmbar.

4.1.3 5-Bromindirubin (31)



5-Bromindirubin wird aus 5-Bromisatin und Indoxylacetat synthetisiert. Das nach dem Waschen und Trocknen anfallende schwarze Pulver wird aus Pyridin umkristallisiert. Nach Trocknung der entstandenen dunkelvioletten Kristallklumpen und Entfernung des im Kristallverband eingeschlossenen Pyridins bei 140 °C am Ölpumpenvakuum, erhält man in guter Ausbeute schwarze Kristalle mit rotvioletter Schimmer.

Im ^1H -NMR-Spektrum erfahren durch den Einfluß des Bromsubstituenten nur die Signale am ungestrichenen System deutliche Verschiebungen im Vergleich zum unsubstituierten Indirubin (C4H: + 0,18 ppm, C6H: + 0,17 ppm, C7H: - 0,06 ppm). Durch den Tieffeldshift, den das Proton an C6 erfährt, kommt es zusammen mit C7H in einem Multiplett bei 7,42 ppm zur Resonanz (**Abb. 35**).

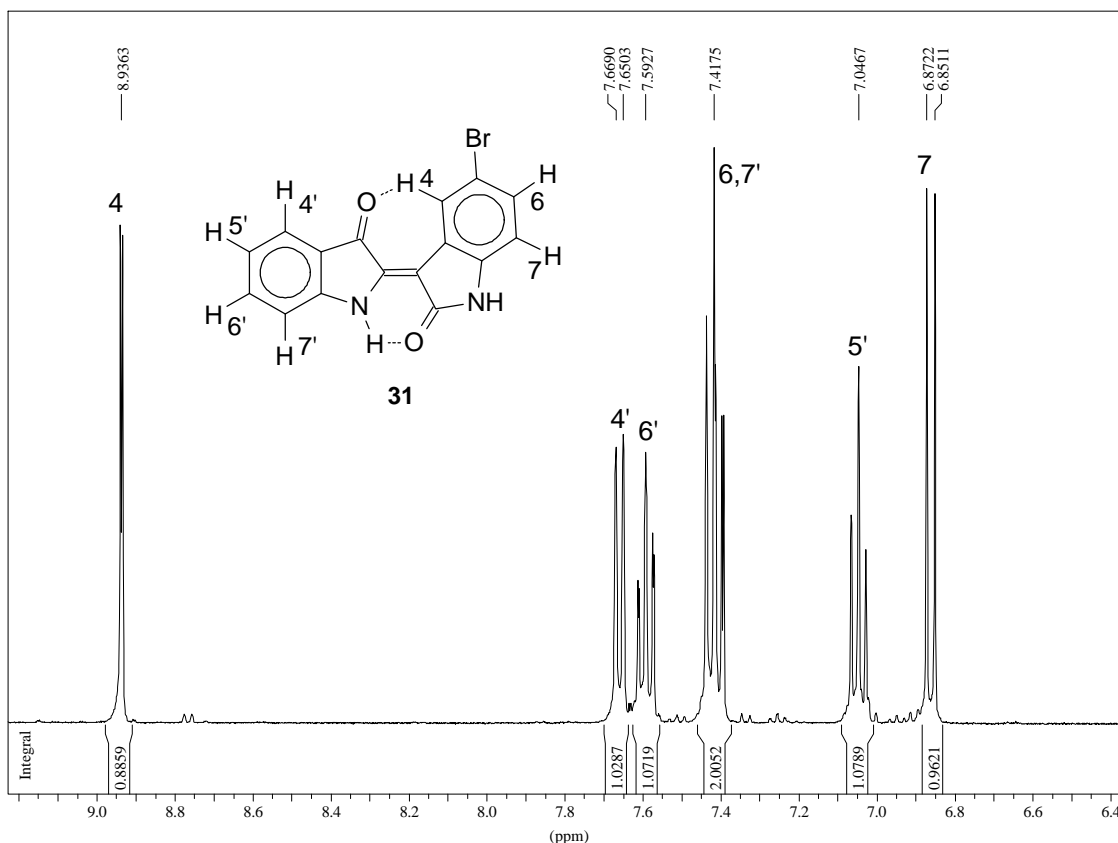
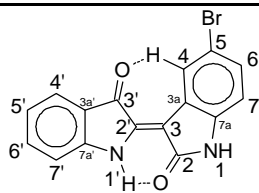


Abb. 35: Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **31**, Bereich der CH-Signale.

Tab. 8: Signallage und Kopplungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **31**

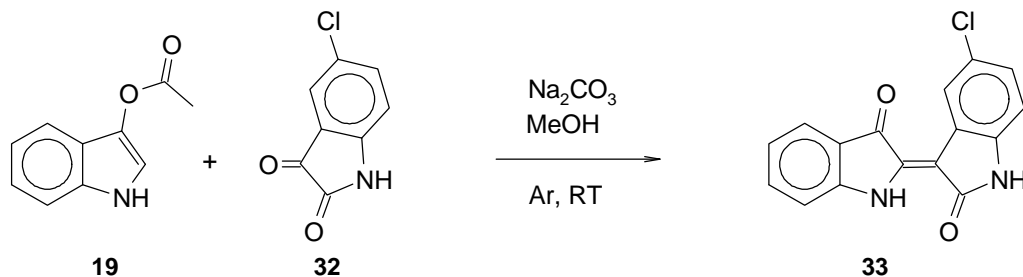
| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|-----------|
| 11,10 und 11,00 | 2 s | N1H, N1'H |
| 8,94 | s | C4H |
| 7,66 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,5$ Hz | C4'H |
| 7,59 | m | C6'H |
| 7,41- 7,37 | m | C6H, C7'H |
| 7,05 | pt | C5'H |
| 6,86 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,4$ Hz | C7H |

Im $^{13}\text{C-NMR-Spektrum}$ von 5-Bromindirubin finden im Vergleich zu unsubstituierten Indirubin nur am ungestrichenen System merkliche Änderungen statt. Dabei erfährt die größte Verschiebung das Kohlenstoffatom C5 mit einem Hochfeldshift von -8,3 ppm. Diesen Effekt, daß trotz eines elektronenziehenden Substituenten ein Tieffeldshift erfolgt, beobachtet man in viel stärkerem Maße auch bei einer Substitution mit Iod. Er ist auf die Abschirmung durch die großen Elektronenhüllen zurückzuführen. C7a erfährt einen Hochfeldshift um -1,33 ppm, ein Inkrement, wie es auch für die *para*-Substitution an Benzol festgestellt wurde. Für C7a' wird nur eine leichte Tieffeldverschiebung festgestellt. Umgekehrte Verhältnisse für C7a und C7a' findet man im $^{13}\text{C-NMR-Spektrum}$ von 5'-Bromindirubin, daher muß die vormals (Hössel, 1995) getroffene Zuordnung der Signale für C7a und C7a' im $^{13}\text{C-NMR-Spektrum}$ des Indirubins umgekehrt werden (siehe Anhang, Kapitel 8.1.1).

Tab. 9: Signallage und Kopplungen im ^{13}C -NMR-Spektrum von **31****31**

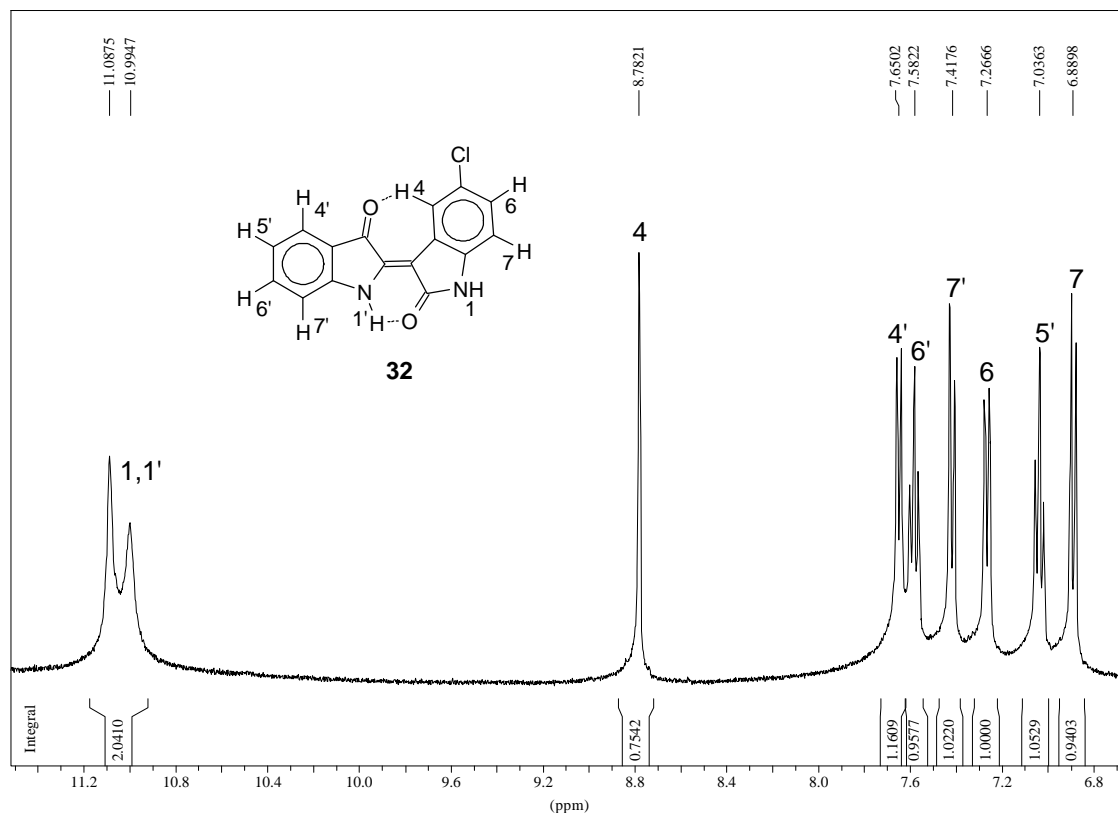
| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|----------------------------------|-----------|
| 188,77 | s | C3' |
| 170,50 | s | C2 |
| 152,42 | s | C2' |
| 139,74 | s | C7a |
| 139,16 | s | C7a' |
| 137,29 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 160,9$ Hz | C6' |
| 131,03 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 167,1$ Hz | C4 |
| 126,60 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 171,3$ Hz | C6 |
| 124,49 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 164,0$ Hz | C4' |
| 123,41 | s | C3a |
| 121,64 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 164,4$ Hz | C5' |
| 118,92 | s | C3a' |
| 113,53 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 167,8$ Hz | C7' |
| 112,89 | s | C5 |
| 111,24 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 165,1$ Hz | C7 |
| 104,92 | s | C3 |

4.1.4 5-Chlorindirubin (**33**)



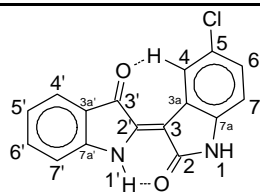
5-Chlorindirubin (**33**) wird aus 5-Chlorisatin und Indoxylacetat synthetisiert und fällt nach dem Waschen und Trocknen in sehr guten Ausbeuten als violetteres Pulver an, das nicht weiter aufgereinigt werden muß.

Im ^1H -NMR-Spektrum zeigen sich aufgrund des generell geringen Einflusses eines Chlorsubstituenten an einem Benzolkern nur geringe Unterschiede zum unsubstituierten Indirubinsystem. Das Signal des C5-Protons verschwindet, so daß nun das Pseudotriplett von C5'H klar erkennbar wird.

Abb. 36: ¹H-NMR-Spektrum von 32Tab. 10: Signallage und Kopplungen im ¹H-NMR-Spektrum von 32

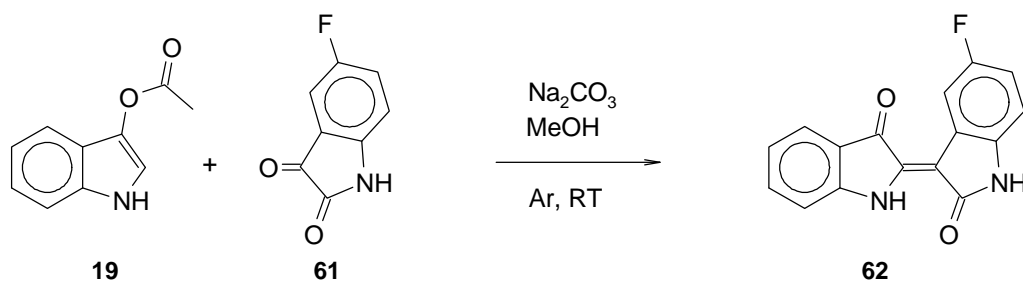
| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|---|-----------|
| 11,09 und 10,99 | 2 s | N1H, N1'H |
| 8,78 | s | C4H |
| 7,65 | d, ³ J _{H,H} = 7,6 Hz | C4'H |
| 7,58 | pt | C6'H |
| 7,42 | d, ³ J _{H,H} = 7,8 Hz | C7'H |
| 7,27 | d, ³ J _{H,H} = 8,3 Hz | C6H |
| 7,04 | pt | C5'H |
| 6,89 | d, ³ J _{H,H} = 8,3 Hz | C7H |

Im ¹³C-NMR-Spektrum von 5-Chlorindirubin finden im Vergleich zum unsubstituierten Indirubin nur geringe Veränderungen statt. Dabei erfährt die größte Verschiebung das Kohlenstoffatom 5 mit einem Tieffeldshift von +3,8 ppm. Dieser sehr geringe Effekt ist typisch für eine Chlorsubstitution an einem Benzolkern. C7a erfährt einen Hochfeldshift von etwa -1,7 ppm, ein Inkrement, wie es auch für die *para*-Substitution an Benzol festgestellt wurde. Für C7a' wird nur eine leichte Tieffeldverschiebung festgestellt. Dies bestätigt die getroffene Zuordnung der Signale für C7a und C7a' im ¹³C-NMR-Spektrum des Indirubins (siehe Anhang, Kapitel 8.1.1)

Tab. 11: Signallage und Kopplungen im ^{13}C -NMR-Spektrum von **32**

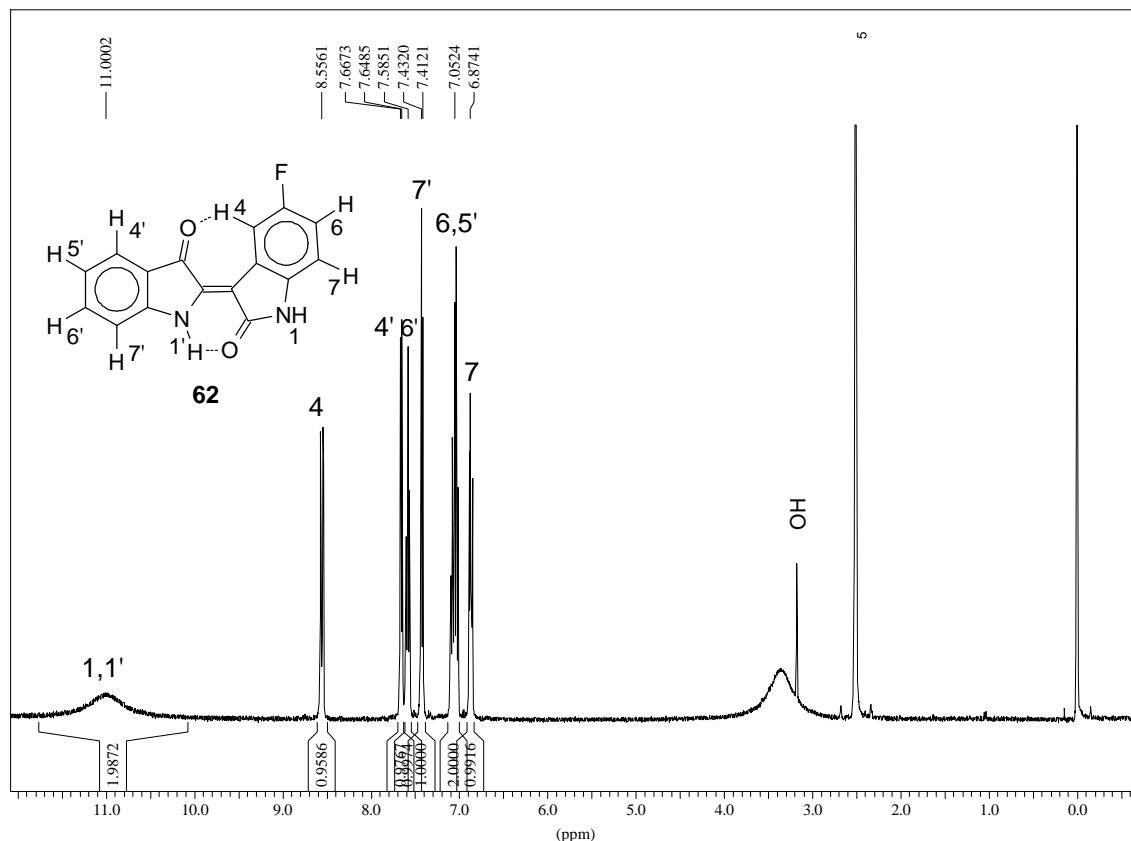
| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-------------------|----------------------------------|--------------|
| 188,72 | s | C3' |
| 170,52 | s | C2 |
| 152,39 | s | C2' |
| 139,31 und 139,10 | 2 s | C7a und C7a' |
| 137,21 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 159,8$ Hz | C6' |
| 128,16 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 167,0$ Hz | C4 |
| 125,00 | s | C5 |
| 124,41 und 123,76 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 163,8$ Hz | C6 und C4' |
| 122,85 | s | C3a |
| 121,54 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 165,4$ Hz | C5' |
| 118,85 | s | C3a' |
| 113,50 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 168,6$ Hz | C7' |
| 110,61 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 164,6$ Hz | C7 |
| 104,95 | s | C3 |

4.1.5 5-Fluorindirubin (**62**)



5-Fluorindirubin wird aus 5-Fluorindisatin (**61**) und Indoxylacetat synthetisiert und fällt nach dem Waschen und Trocknen in sehr guten Ausbeuten als violettes Pulver an, das nicht weiter aufgereinigt werden muß.

Im ^1H -NMR-Spektrum zeigt sich deutlich der Effekt des Fluorsubstituenten. Zum einen in der Hochfeldverschiebung der Signale von C4H (-0,22 ppm) und C6H (-0,19 ppm) im Vergleich zum unsubstituierten Indirubin, zum anderen im Auftreten der $^3J_{\text{F,H}}$ - und $^4J_{\text{F,H}}$ -Kopplungen in den Signalen von C4H bzw. C7H. Die $^3J_{\text{F,H}}$ -Kopplungskonstante von C6H kann wegen der Überlagerung mit dem Signal von C5' nicht bestimmt werden.

Abb. 37: ^1H -NMR-Spektrum von **51**.Tab. 12: Signallage und Kopplungen im ^1H -NMR-Spektrum von **62**

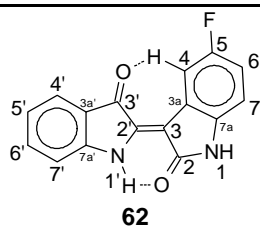
| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|---|-----------|
| 11,00 | s ¹⁾ | N1H, N1'H |
| 8,56 | d, $^3J_{\text{F,H}} = 10,6$ Hz | C4H |
| 7,65 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,4$ Hz | C4'H |
| 7,58 | pt | C6'H |
| 7,42 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,2$ Hz | C7'H |
| 7,10 - 7,01 | m | C6H, C5'H |
| 6,87 | dd ²⁾ , $^3J_{\text{H,H}} = 8,3$ Hz $^4J_{\text{F,H}} = 4,7$ Hz | C7H |

¹⁾verbreitert, ²⁾Doppeldoublett

Im ^{13}C -NMR -Spektrum sind wiederum nur an den Signalen des ungestrichenen Systems deutliche Lageveränderungen im Vergleich zum unsubstituierten Indirubin festzustellen. Deutlich bemerkbar macht sich hier der Fluorsubstituent durch den starken Tieffeldshift von +36,2 ppm an Position 5. Die *ortho*-Positionen zeigen die typischen Hochfeldverschiebungen (C4: -13,91 ppm; C6: -12,86 ppm). Die *meta*-Positionen zeigen, wie zu erwarten war, keine bzw. nur sehr geringe Veränderungen (C3a: 0,00 ppm, C7: +0,56 ppm). Die *para*-Position zeigt die zu erwartende leichte Tieffeldverschiebung (C7a: -3,76 ppm). Klar zur Zuordnung der Signale lassen sich die ^{19}F - ^{13}C -Kopplungen heranziehen (siehe Tab. 13). Bemerkenswert ist die $^3J_{\text{C,F}}$ -Kopplung zu C3a (10,8 Hz), die eine klare Unterscheidung zum Signal des C3a' zuläßt. Die zu erwartende kleine $^4J_{\text{C,F}}$ -Kopplung (etwa 3 Hz) zu C7a kann nicht bestimmt werden, da das Signal im protonenkoppelten Spektrum vom Signal des C6' überla-

gert wird und im protonengekoppelten Spektrum zusätzliche Protonenkopplungen auftreten und ein Multiplett entsteht.

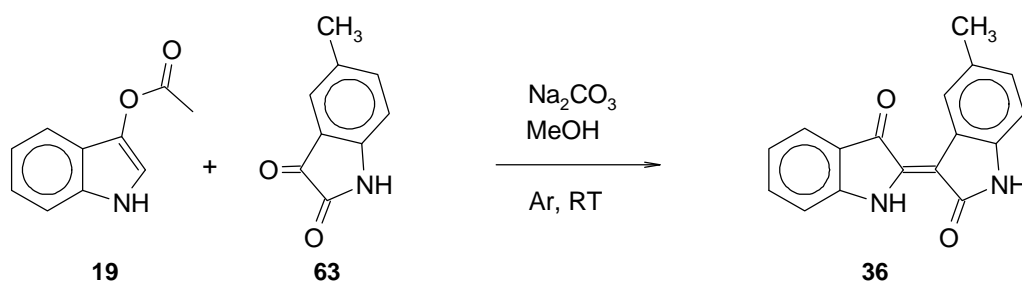
Tab. 13: Signallage und Kopplungen im ^{13}C -NMR-Spektrum von **62**



| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--|-----------|
| 188,96 | s | C3' |
| 171,02 | s | C2 |
| 157,40 | d, $^1J_{\text{C,F}} = 233,2$ Hz | C5 |
| 152,60 | s | C2' |
| 139,12 | s | C7a' |
| 137,36 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 162,8$ Hz | C6' |
| 137,31 | s | C7a |
| 124,56 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 163,5$ Hz | C4' |
| 122,41 | d, $^3J_{\text{C,F}} = 10,8$ Hz | C3a |
| 121,64 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 164,2$ Hz | C5' |
| 118,98 | s | C3a' |
| 115,24 | dd ¹⁾ , $^1J_{\text{C,H}} = 188,9$ Hz $^2J_{\text{C,F}} = 24,7$ Hz | C4 |
| 113,57 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 162,0$ Hz | C7' |
| 111,34 | dd ¹⁾ , $^1J_{\text{C,H}} = 169,3$ Hz $^2J_{\text{C,F}} = 27,6$ Hz | C6 |
| 110,13 | dd ¹⁾ , $^1J_{\text{C,H}} = 163,5$ Hz $^3J_{\text{C,F}} = 8,7$ Hz | C7 |
| 105,93 | s | C3 |

¹⁾Doppeldublett.

4.1.6 5-Methylindirubin (36)



5-Methylindirubin (**36**) wird aus 5-Methylisatin (**63**) und Indoxylacetat synthetisiert und fällt nach dem Waschen und Trocknen in sehr guten Ausbeuten als violettes Pulver an, das nicht weiter aufgereinigt werden muß.

Im $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ finden Veränderungen im Vergleich zum unsubstituierten Indirubin nur am ungestrichenen System statt. Die Verschiebungen der Signallagen (C4H und C6H: $-0,18$ ppm; C7H: $-0,10$ ppm) liegen dabei im zu erwartenden Bereich.

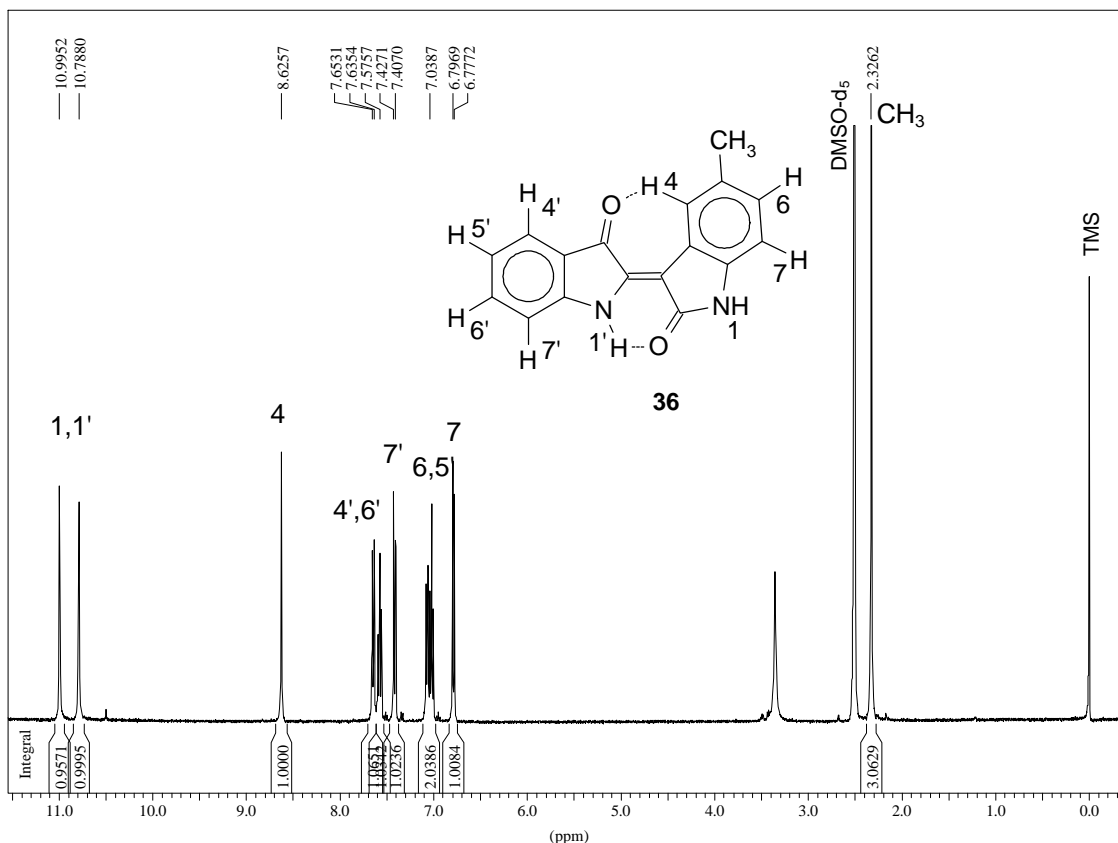
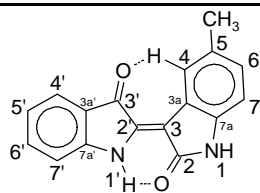


Abb. 38: $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ von **36**.

Tab. 14: Signallage und Kopplungen im $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ von **36**

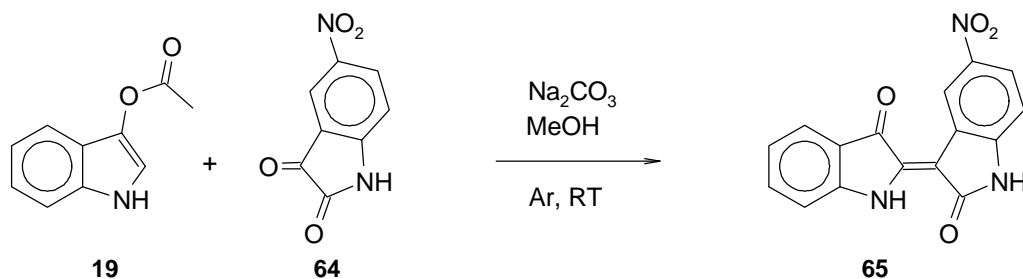
| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|-----------------|
| 11,00 und 10,79 | 2 s | N1H, N1'H |
| 8,63 | s | C4H |
| 7,64 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,6$ Hz | C4'H |
| 7,58 | pt | C6'H |
| 7,42 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,9$ Hz | C7'H |
| 7,08 - 7,00 | m | C6H, C5'H |
| 6,79 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,9$ Hz | C7H |
| 2,33 | s | CH ₃ |

Im $^{13}\text{C-NMR-Spektrum}$ finden deutliche Signalveränderungen nur am nichtgestrichenen System statt. C5 erfährt einen Tieffeldshift von $+8,51$ ppm und kommt nun exakt zusammen mit C4 zur Resonanz. Da nur C4 im protonengekoppelten Spektrum zum Dublett aufspaltet, ist trotzdem die Bestimmung der Kopplungskonstanten möglich. Das Signal von C7a (*para*-Stellung zur Substitution) erfährt einen Hochfeldshift von etwa -3 ppm. Dadurch sind die beiden Signale von C7a und C7a' nicht mehr eindeutig zuzuordnen. Das Methylkohlenstoffatom kommt mit $20,99$ ppm in dem für an einem Benzolkern sitzende Methylgruppen charakteristischen Bereich zur Resonanz.

Tab. 15: Signallage und Kopplungen im ^{13}C -NMR-Spektrum von **36****36**

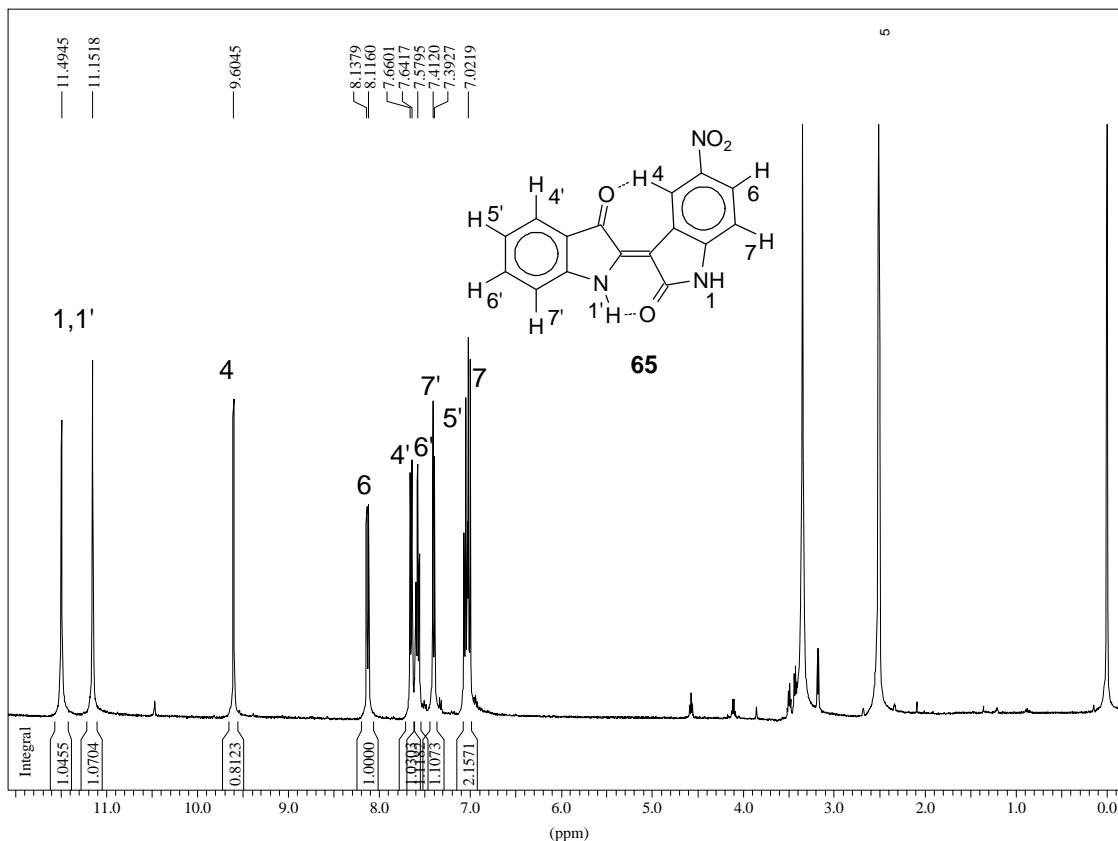
| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-------------------|----------------------------------|-----------------|
| 188,49 | s | C3' |
| 171,93 | s | C2 |
| 152,38 | s | C2' |
| 138,65 und 138,08 | 2 s | C7a, C7a' |
| 136,96 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 161,6$ Hz | C6' |
| 129,72 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 157,4$ Hz | C4 |
| 129,72 | s | C5 |
| 125,11 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 164,4$ Hz | C6 |
| 124,19 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 163,7$ Hz | C4' |
| 121,45 | s | C3a |
| 121,09 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 164,4$ Hz | C5' |
| 119,94 | s | C3a' |
| 113,33 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 168,5$ Hz | C7' |
| 109,17 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 161,6$ Hz | C7 |
| 106,79 | s | C3 |
| 20,99 | q, $^1J_{\text{C,H}} = 126,5$ Hz | CH ₃ |

4.1.7 5-Nitroindirubin (**65**)



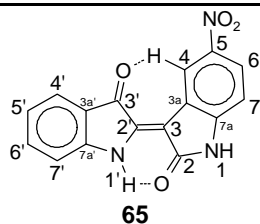
5-Nitroindirubin (**65**) wird aus 5-Nitroisatin (**64**) und Indoxylacetat synthetisiert und fällt nach dem Waschen und Trocknen in sehr guten Ausbeuten als violettes Pulver an, das nicht weiter aufgereinigt werden muß.

Im ^1H -NMR-Spektrum von **65** bewirkt der Nitrosubstituent im nichtgestrichenen System starke Tieffeldverschiebungen. C4H wird im Vergleich zum unsubstituierten Indirubin um +0,84 ppm tieffeldverschoben und kommt nun bei 9,60 ppm zur Resonanz. C6H wird um +0,88 ppm und C7H wird um +0,08 ppm tieffeldverschoben.

Abb. 39: ^1H -NMR-Spektrum von **65**Tab. 16: Signallage und Kopplungen im ^1H -NMR-Spektrum von **65**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|-----------|
| 11,49 und 11,15 | 2 s | N1H, N1'H |
| 9,60 | s | C4H |
| 8,13 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,7$ Hz | C6H |
| 7,64 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,5$ Hz | C4'H |
| 7,58 | pt | C6'H |
| 7,40 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,1$ Hz | C7' |
| 7,05 | pt | C5'H |
| 7,01 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,7$ Hz | C7H |

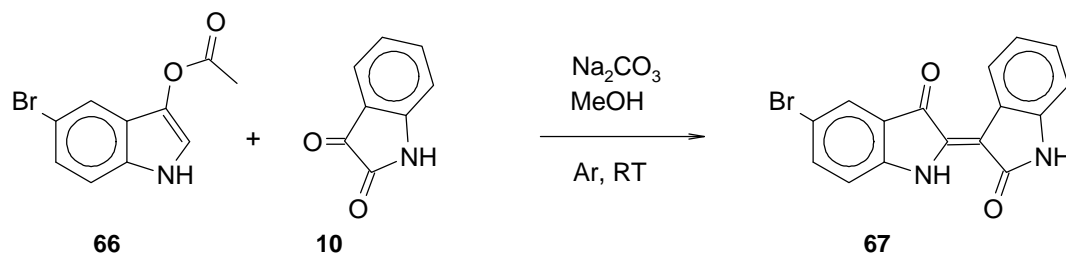
Auch im ^{13}C -NMR-Spektrum übt der Nitrosubstituent den zu erwartenden, starken Einfluß auf das ungestrichene Indirubinteilsystem aus. Das Kohlenstoffatom an der Substitutionsposition erfährt einen Tieffeldshift von +20,4 ppm. Die Signale von C4 und C6 erfahren einen Hochfeldshift im Bereich um -4,6 ppm. Das Signal von C7a wird um +4,64 ppm tieffeldverschoben, die Signale von C3a und C7 erfahren nur geringe Änderungen.

Tab. 17: Signallage und Kopplungen im ^{13}C -NMR-Spektrum von **65**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-------------------|----------------------------------|------------|
| 188,78 | s | C3' |
| 170,93 | s | C2 |
| 152,38 | s | C2' |
| 145,71 | s | C7a |
| 141,63 | s | C5 |
| 139,97 | s | C7a' |
| 137,37 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 161,6$ Hz | C6' |
| 124,69 und 124,60 | 2 d ¹⁾ | C4 und C4' |
| 121,97 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 163,0$ Hz | C5' |
| 121,59 | s | C3a |
| 119,48 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 167,8$ Hz | C6 |
| 118,83 | s | C3a' |
| 113,68 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 167,8$ Hz | C7' |
| 109,27 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 167,8$ Hz | C7 |
| 103,51 | s | C3 |

¹⁾ keine vollständige Auflösung der Signale, die $^1J_{\text{C,H}}$ -Kopplungskonstanten können nicht bestimmt werden.

4.1.8 5'-Bromindirubin (**67**)



5'-Bromindirubin wird aus Isatin und 5-Bromindoxylacetat (**66**) synthetisiert und fällt nach dem Waschen und Trocknen in sehr guten Ausbeuten als violettes Pulver an, das nicht weiter aufgereinigt werden muß.

Im ^1H -NMR-Spektrum sind im Vergleich zu Indirubin nur Signale der zur Substitution *ortho*-ständigen Positionen C4'H (+0,11 ppm) und C6'H (+0,15 ppm) verschoben. Die anderen Signale sind kaum verändert.

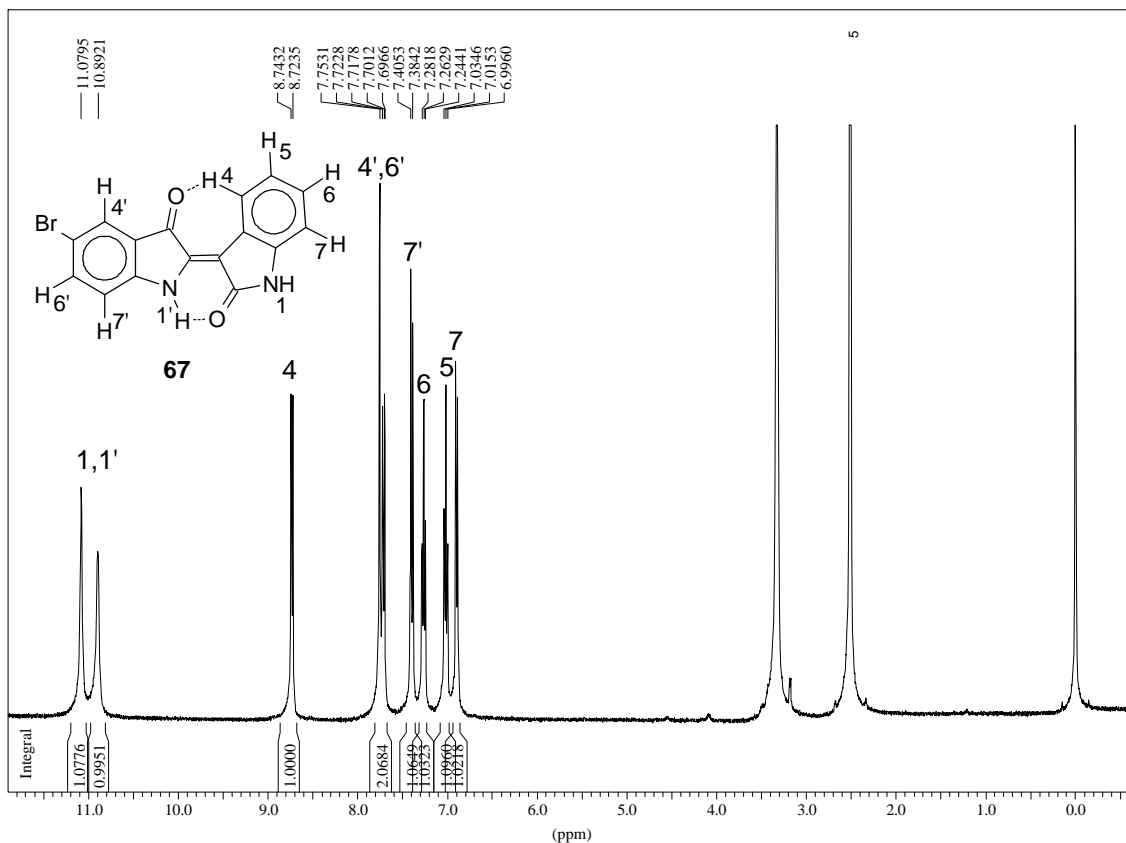


Abb. 40: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **67**.

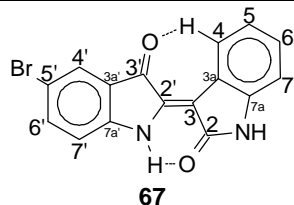
Tab. 18: Signallage und Kopplungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **67**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|-----------|
| 11,08 und 10,89 | 2 s | N1H, N1'H |
| 8,73 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,8$ Hz | C4H |
| 7,76 | s | C4'H |
| 7,71 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,5$ Hz | C6'H |
| 7,39 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,5$ Hz | C7'H |
| 7,26 | pt | C6H |
| 7,02 | pt | C5H |
| 6,89 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,8$ Hz | C7H |

Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum finden signifikante Änderungen im Vergleich zu Indirubin nur am gestrichenen System statt. C5' erfährt mit -8,6 ppm einen für eine Bromsubstitution charakteristischen Hochfeldshift. Die im Indirubinspektrum vorhandene $^1J_{\text{C,H}}$ -Kopplung verschwindet und eine $^3J_{\text{C,H}}$ -Kopplung (+10,4 Hz) mit dem C7'-Proton bleibt erhalten. C7' erfährt einen für eine *meta*-Bromsubstitution charakteristischen Tieffeldshift (+2,34 ppm); sein Signal zeigt keine $^3J_{\text{C,H}}$ -Kopplung, da kein *meta*-ständiges Proton mehr vorhanden ist. Durch diese Überlegungen klären sich nun auch die Verhältnisse im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Indirubin: es wird klar, daß das mit C5 überlagernde Signal (121,19 / 121,21 ppm) von C5' stammt und nicht von C7'. Dem Kohlenstoffatom C7' kann so im Spektrum von Indirubin eindeutig die Resonanz bei 113,15 zugeordnet werden. C7a' erfährt einen schwachen Hochfeldshift von -0,80 ppm (ein Inkrement, wie es auch für die *para*-Bromsubstitution an

Benzol festgestellt wurde); die Lage von C7a bleibt nahezu unverändert (-0,02 ppm). Man findet hier also, wie zu erwarten für C7a und C7a' die umgekehrten Verhältnisse wie im ^{13}C -NMR-Spektrum von 5-Bromindirubin (Kapitel 4.1.3). Die Signale von C5 und C3a/C3a' überlagern sich bei 121,20 ppm.

Tab. 19: Signallage und Kopplungen im ^{13}C -NMR-Spektrum von **67**



| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-------------------|----------------------------------|-----------|
| 187,15 | s | C3' |
| 170,64 | s | C2 |
| 151,23 | s | C2' |
| 141,05 | s | C7a |
| 138,87 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 166,1$ Hz | C6' |
| 137,69 | s | C7a' |
| 129,56 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 159,0$ Hz | C4 |
| 126,31 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 163,0$ Hz | C4' |
| 124,69 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 154,5$ Hz | C6 |
| 121,20 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 160,0$ Hz | C5 |
| 121,20 und 120,64 | 2 s | C3a, C3a' |
| 115,49 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 169,4$ Hz | C7' |
| 112,63 | s | C5' |
| 109,54 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 161,4$ Hz | C7 |
| 107,43 | s | C3 |

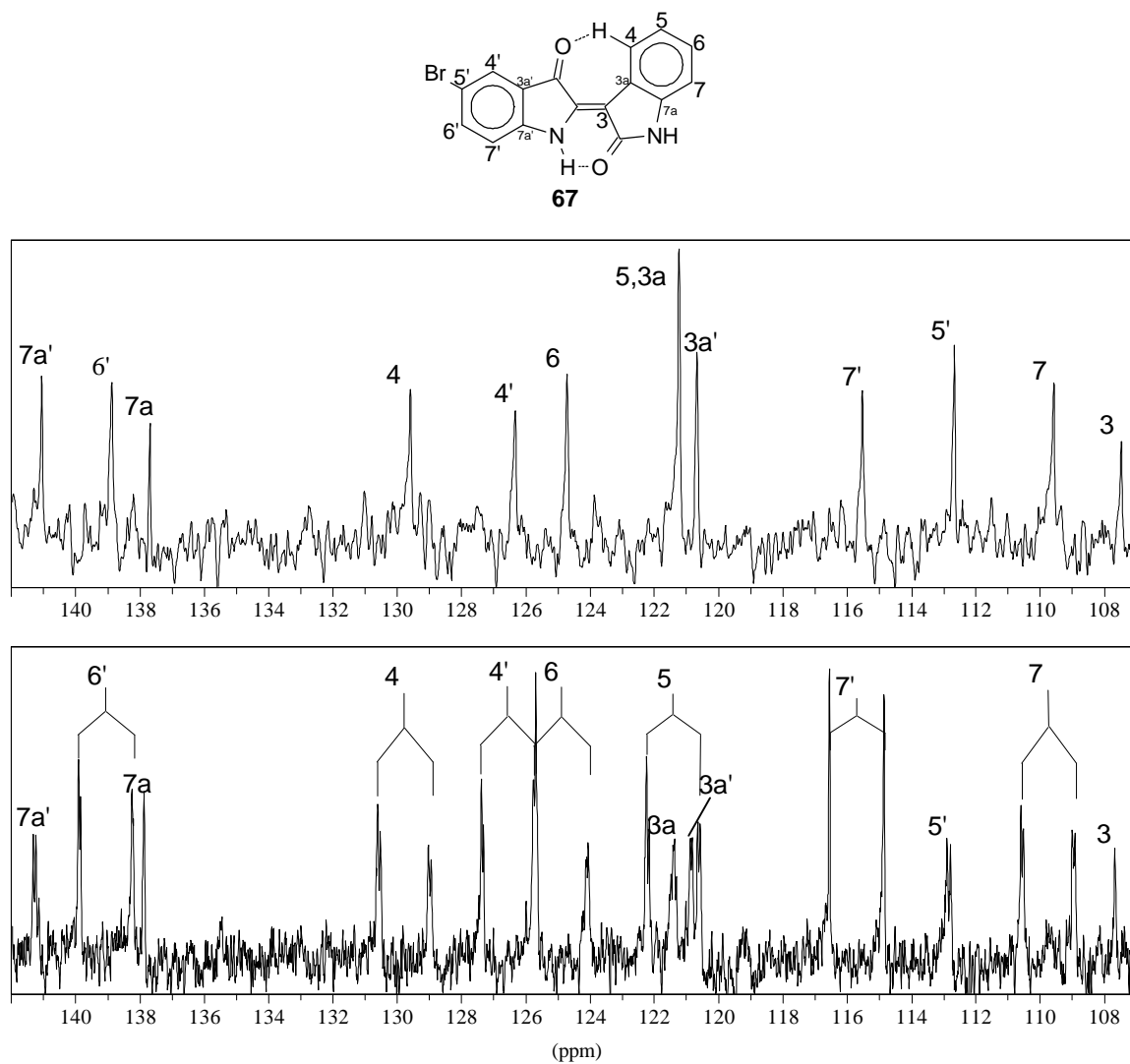
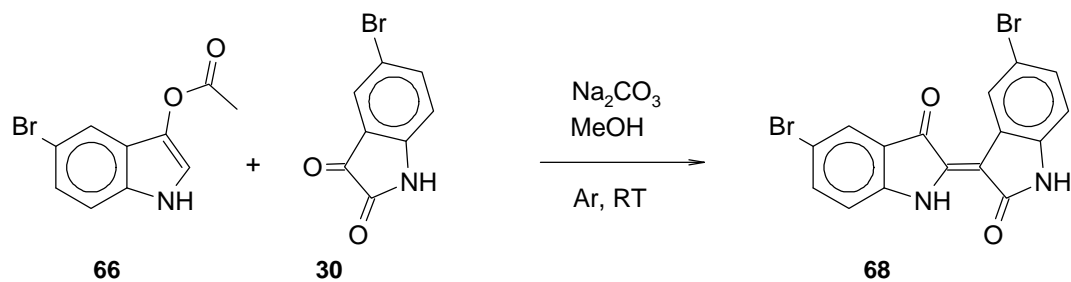


Abb. 41: Ausschnitt aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum von **67**, 107 - 142 ppm, oben: protonenkoppelt, die Signale von C5 und eines der beiden Signale C3a/C3a' überlagern unten: protonengekoppelt

4.1.9 5,5'-Dibromindirubin (**68**)



5,5'-Dibromindirubin (**68**) wird aus 5-Bromisatin und 5-Bromindoxylacetat synthetisiert und fällt nach dem Waschen und Trocknen in sehr guten Ausbeuten als violettes Pulver an. Eine Verunreinigung von 2,8 Massen-% 5'-Bromindirubin konnte nicht entfernt werden.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sind die Signale des nichtgestrichenen Teils mit den entsprechenden von 5-Bromindirubin (Kapitel 4.1.3) nahezu identisch und jene des gestrichenen Teils mit den entsprechenden von 5'-Bromindirubin (Kapitel 4.1.8).

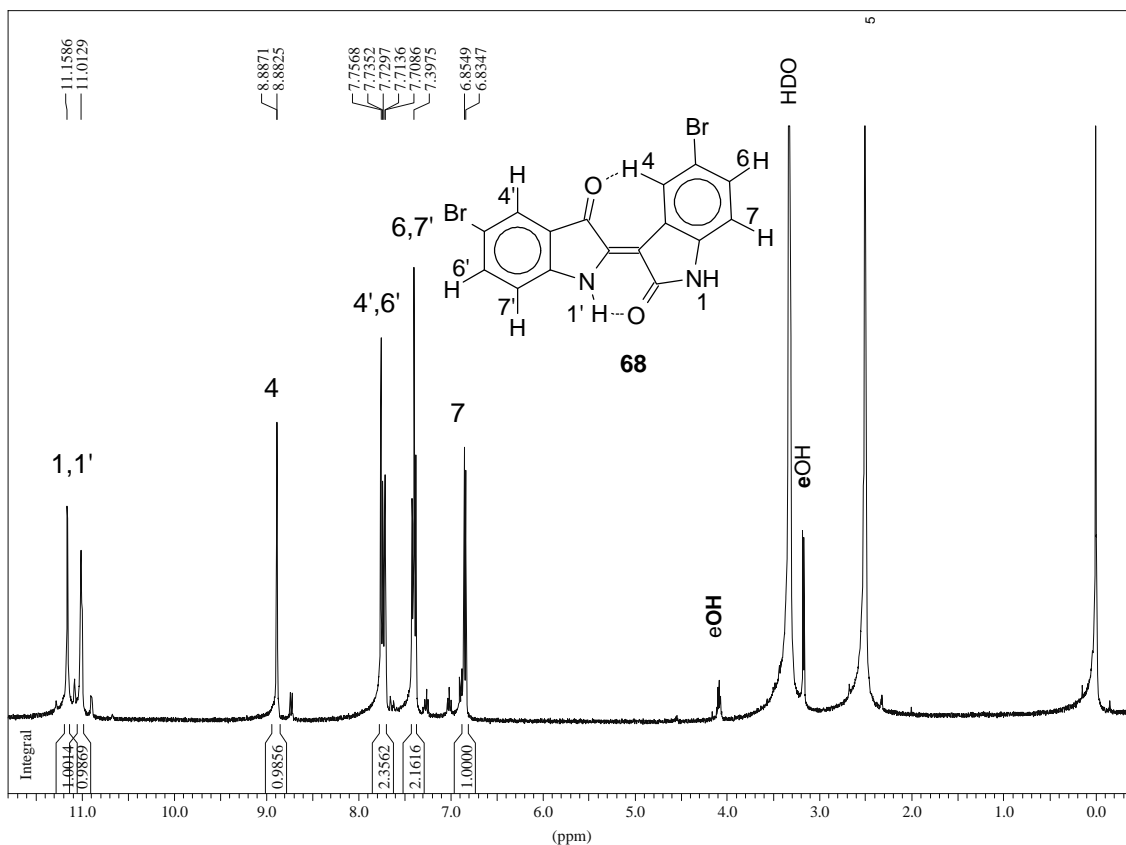


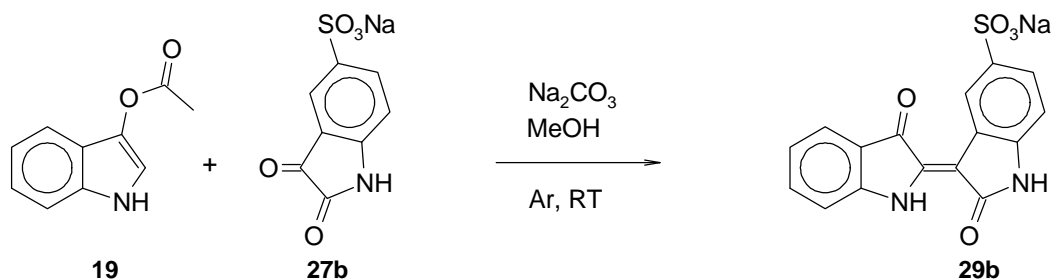
Abb. 42: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **68**, die Verunreinigung im Bereich der aromatischen CH-Signale sowie bei den NH-Signalen stammen von 5'-Bromindirubin (**67**) (2,8 Massen-%).

Tab. 20: Signallage und Kopplungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **68**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|-----------|
| 11,16 und 11,01 | 2 s | N1H, N1'H |
| 8,88 | s | C4H |
| 7,76 | s | C4'H |
| 7,71 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,5$ Hz | C6'H |
| 7,42 - 7,36 | m | C6H, C7'H |
| 6,84 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,1$ Hz | C7H |

Aufgrund der schlechten Löslichkeit wurde kein $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum aufgenommen.

4.1.10 Indirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (29b)



Das Natriumsalz der Indirubin-5-sulfonsäure wird aus dem Natriumsalz der Isatin-5-sulfonsäure (**27b**) und Indoxylacetat synthetisiert. Nach dem Waschen und Trocknen liegt die Substanz in guten Ausbeuten als violetter Kristallkuchen vor und muß nicht weiter aufgereinigt werden.

Im $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ zeigen nur die Signale des ungestrichenen Systems Veränderungen gegenüber unsubstituiertem Indirubin. Durch den Sulfonsäuresubstituenten erfahren die *ortho*-Positionen extreme Verschiebungen: C4 erscheint um +0,36 ppm und C6H um +0,31 ppm tieffeldverschoben. Die eindeutige Unterscheidung zwischen den Signalen für C6H und C4'H läßt sich mit Hilfe des $^1\text{H-NMR-Spektrums}$ von 5'-Bromindirubin-5-sulfonat (**69a**) (Kapitel 4.1.11) treffen, da dort C4'H durch den Bromsubstituenten einen Tieffeldshift erfährt, C6H jedoch nicht.

Einen ungewöhnlichen Hochfeldshift für die *meta*-Position zum Sulfonsäuresubstituenten von -0,08 ppm beobachtet man für C7H. Eine Erklärung könnte sein, daß nicht die Säure vorliegt, sondern die deprotonierte Form. Dies könnte auch erklären, daß die Beeinflussung der *ortho*-Positionen, im Vergleich zu den am Benzolkern üblichen Werten von +0,64 ppm für einen Sulfonsäuresubstituenten gering ist.

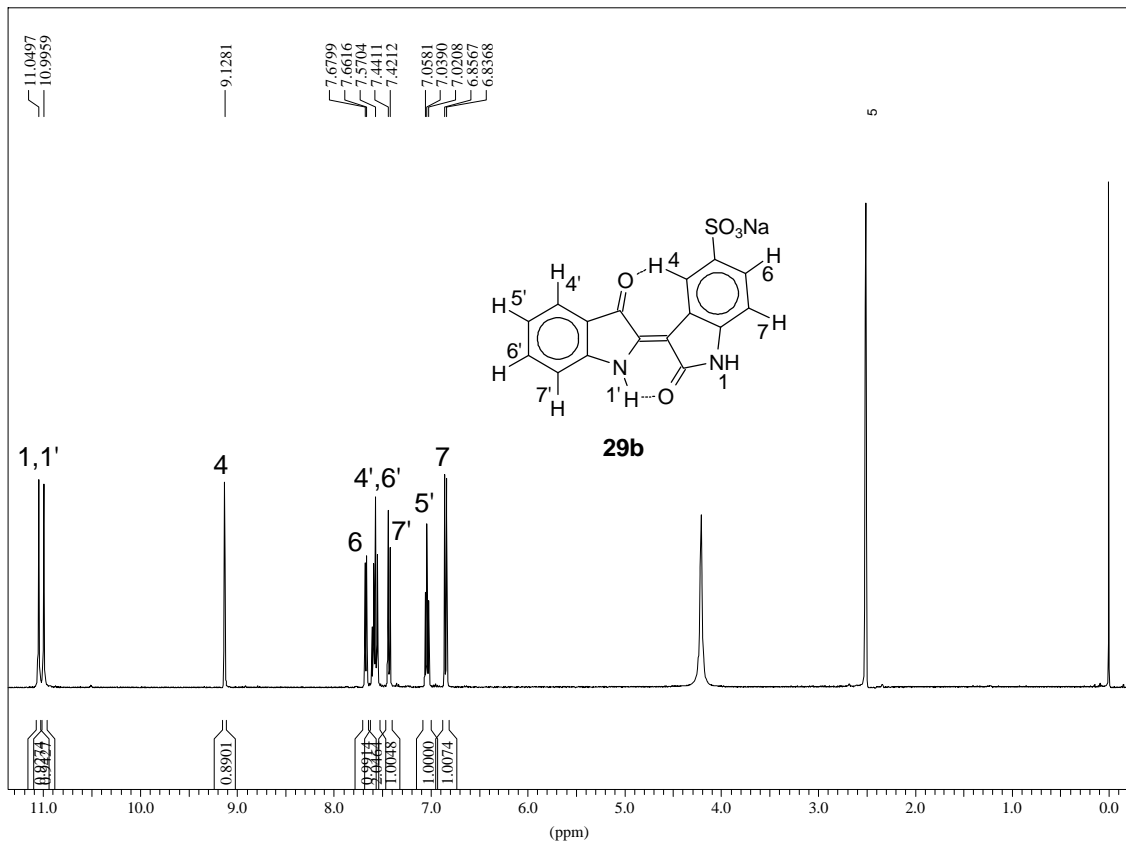
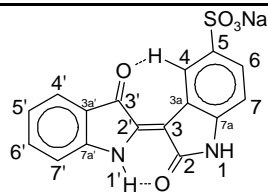


Abb. 43: ^1H -NMR-Spektrum von **29b**

Tab. 21: Signallage und Kopplungen im ^1H -NMR-Spektrum von **29b**

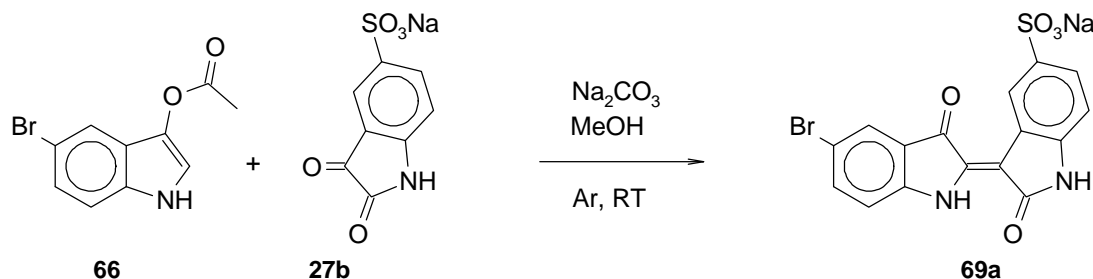
| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|-----------|
| 11,05 und 10,99 | 2 s | N1H, N1'H |
| 9,13 | s | C4H |
| 7,67 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,4$ Hz | C4'H |
| 7,61 - 7,54 | m | C6H, C6'H |
| 7,43 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,0$ Hz | C7'H |
| 7,04 | m | C5'H |
| 6,84 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,0$ Hz | C7H |

Im ^{13}C -NMR-Spektrum zeigen sich nur am ungestrichenen System bemerkenswerte Änderungen im Vergleich zum unsubstituierten Indirubin. Die 5-Position wird aufgrund des stark elektronenziehenden Sulfonatsubstituenten erwartungsgemäß stark tieffeldverschoben (+17,24 ppm).

Tab. 22: Signallage und Kopplungen im ^{13}C -NMR-Spektrum von **29b****29b**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-------------------|----------------------------------|-----------|
| 188,33 | s | C3' |
| 171,14 | s | C2 |
| 152,39 | s | C2' |
| 141,64 und 140,89 | s | C7a, 7a' |
| 138,45 | s | C5 |
| 137,02 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 167,0$ Hz | C6' |
| 126,83 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 163,3$ Hz | C4 |
| 124,27 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 165,6$ Hz | C4' |
| 122,57 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 168,4$ Hz | C6 |
| 121,28 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 157,9$ Hz | C5' |
| 120,50 | s | C3a |
| 118,98 | s | C3a' |
| 113,39 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 168,6$ Hz | C7' |
| 108,20 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 163,3$ Hz | C7 |
| 106,25 | s | C3 |

4.1.11 5'-Bromindirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz, Dihydrat) (**69a**)



Das Natriumsalz der 5'-Bromindirubin-5-sulfonsäure (**69a**) wird aus dem Natriumsalz der 5'-Bromisatin-5-sulfonsäure und 5-Bromindoxylacetat synthetisiert. Das nach dem Waschen und Trocknen in guten Ausbeuten anfallende violette Pulver stellt das Dihydrat dar und wird nicht weiter aufgereinigt.

Im Vergleich zu Indirubin-5-sulfonat erfahren im ^1H -NMR-Spektrum nur Signale des gestrichenen Systems wesentliche Änderungen. Das Dublett von C4'H erfährt durch die 5'-Bromsubstitution einen Tieffeldshift von +0,12 ppm, während das Dublett des C6-Protons unverändert bleibt. Dadurch kann eine sichere Zuordnung der Signale für C6H und C4'H im ^1H -NMR-Spektrum von Indirubin-5-sulfonat vorgenommen werden. Das Signal von C6'H wird um +0,16 ppm tieffeldverschoben.

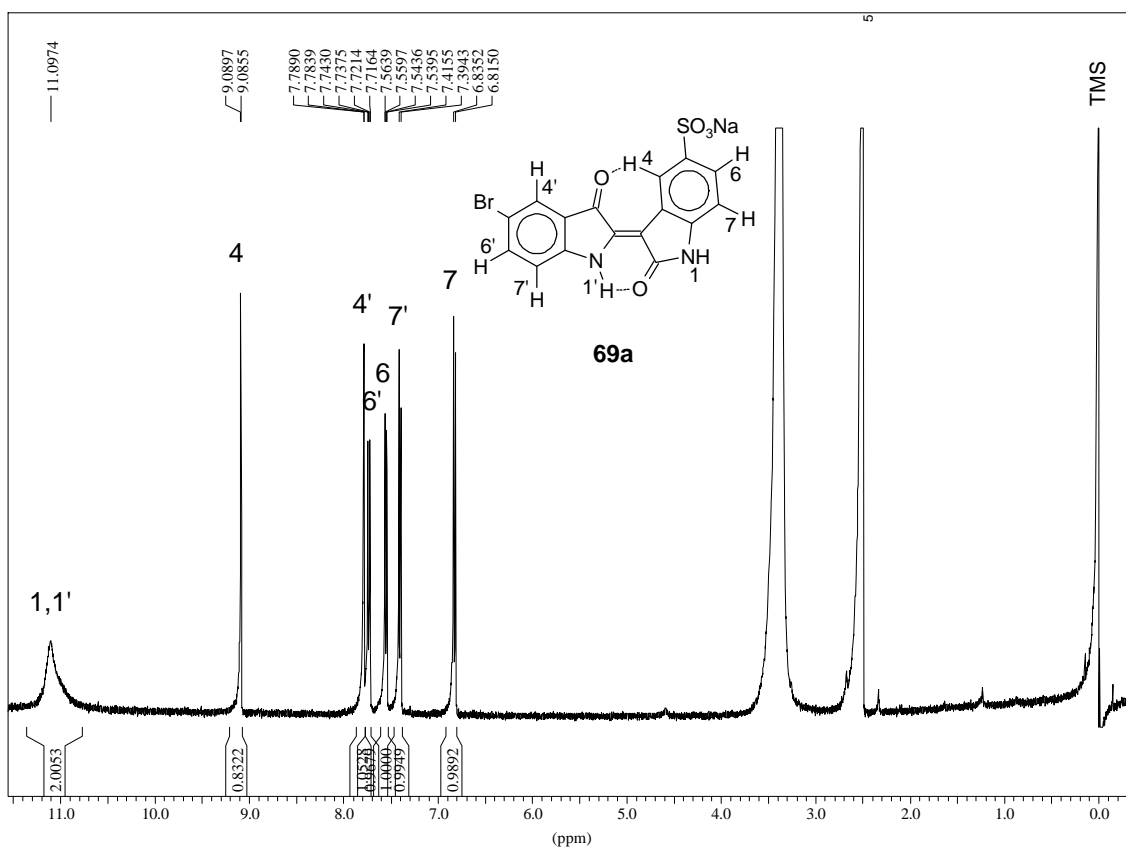


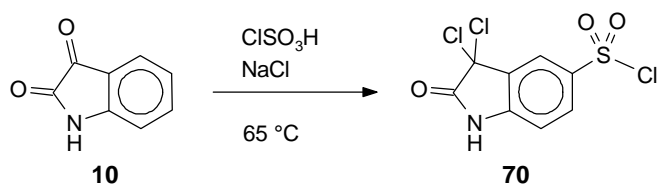
Abb. 44: ^1H -NMR-Spektrum von **69a**

Tab. 23: Signallage und Kopplungen im ^1H -NMR-Spektrum von **69a**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|-----------|
| 11,11 | $S_{\text{verbreitert}}$ | N1H, N1'H |
| 9,09 | s | C4H |
| 7,79 | s | C4'H |
| 7,73 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,5$ Hz | C6'H |
| 7,55 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,0$ Hz | C6H |
| 7,40 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,5$ Hz | C7'H |
| 6,82 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,0$ Hz | C7H |

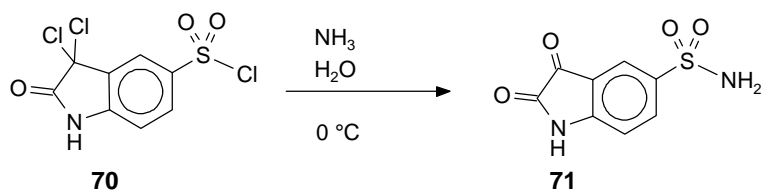
Das Natriumsalz der 5'-Bromindirubin-5-sulfonsäure zeigt trotz der Sulfonatgruppe eine sehr geringe Löslichkeit in DMSO und Wasser. Es gelingt deshalb selbst bei 90 °C in einem 1:1-Gemisch aus deuteriertem Wasser und DMSO nicht, genügend Substanz in Lösung zu bringen, um ein ^{13}C -NMR-Spektrum aufzunehmen.

4.1.12 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonylchlorid (70)



Die Reaktion wird nach Haller (1938 a) durchgeführt. Isatin wird portionsweise unter Rühren in Chlorsulfonsäure eingetragen. Die entstehende dunkelbraune Lösung wird für eine Stunde bei $65\text{ }^\circ\text{C}$ gehalten. Dann wird portionsweise Natriumchlorid eingetragen. Anschließend wird die Reaktionsmischung auf Eis gegossen. Die sich dabei abscheidende gelbliche, gummiartige Masse pulverisiert man nach dem Trocknen und erhält ein ockergelbes Pulver (DC-Reinheit), das so für weitere Umsetzungen eingesetzt werden kann.

4.1.13 Isatin-5-sulfonamid (71)



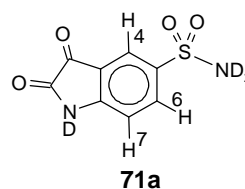
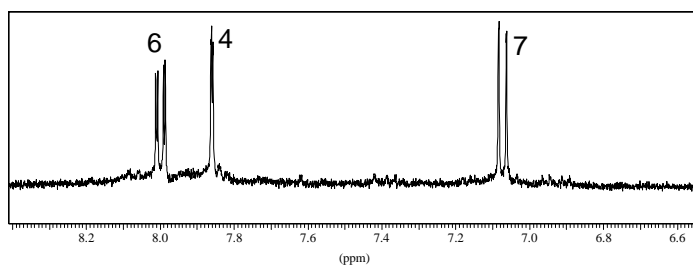
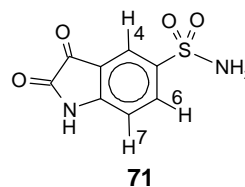
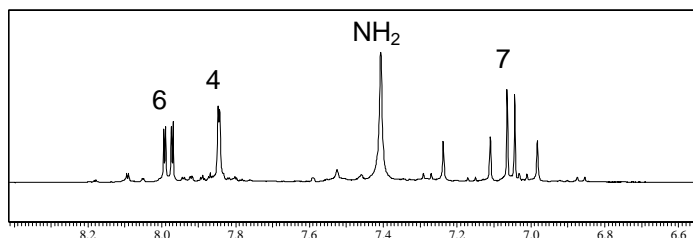
Gekühlte 25 %ige Ammoniaklösung wird unter Rühren portionsweise mit 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonylchlorid (70) versetzt. Die sich bildende rote Lösung rührt man zunächst weiter und säuert dann unter Kühlung mit Salzsäure an. Wasser wird entfernt und der zurückbleibende orangefarbene Feststoff mit Aceton extrahiert. Das so erhaltene, als orangefarbenes Pulver vorliegende Isatin-5-sulfonamid (71) wird in dieser Reinheitsstufe für die folgende Umsetzung eingesetzt.

Vergleicht man das $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ von 71 mit demjenigen von Isatin-5-sulfonat (Anhang, Kapitel

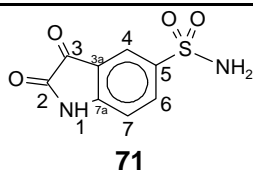
8.1.4) sieht man, daß sämtliche Signale durch den "Austausch" des Sulfonatsubstituenten durch den Sulfonamidsubstituenten einen Tieffeldshift erfahren. Das Signal des C4-Protons wird um $+0,15\text{ ppm}$, das des C6-Protons um $+0,21\text{ ppm}$ und das des C7-Protons um $+0,16\text{ ppm}$ verschoben. Der Effekt ist wahrscheinlich auf das Fehlen der negativen Ladung des Substituenten zurückzuführen. Das NH_2 -Signal ($7,40\text{ ppm}$) liegt im Bereich der aromatischen CH-Signale. Es verschwindet bei Zugabe von D_2O (Abb. 45).

Tab. 24: Signallage und Kopplungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **71**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|-----------------|
| 11,39 | s | N1H |
| 7,98 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,2$ Hz | C6 |
| 7,85 | s | C4 |
| 7,41 | s | NH ₂ |
| 7,05 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,2$ Hz | C7 |

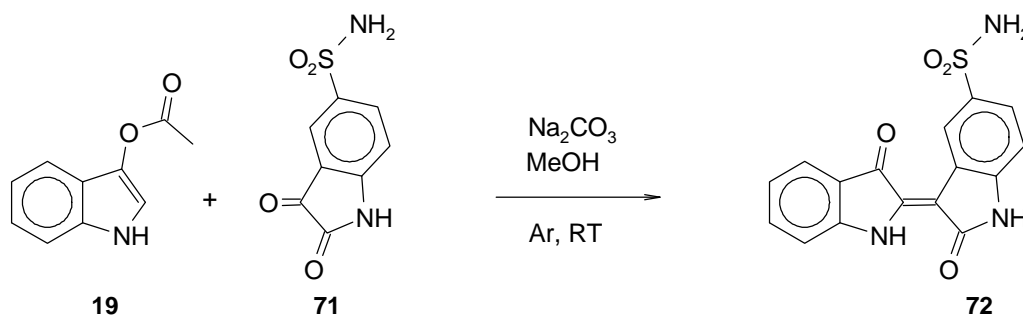
Abb. 45: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **71**; oben: ohne D_2O ; unten: mit D_2O , das NH_2 -Signal verschwindet

Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von **71** liegen die meisten Signale an nahezu gleicher Stelle wie in Isatin-5-sulfonat (Anhang) mit Ausnahme von C5, dessen Signal einen Hochfeldshift von $-4,67$ ppm erfährt, und C7a, dessen Signal einen Tieffeldshift von $+2,03$ ppm erfährt.

Tab. 25: Signallage und Kopplungen im ^{13}C -NMR-Spektrum von **71**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|----------------------------------|-----------|
| 184,22 | s | C3 |
| 159,50 | s | C2 |
| 152,56 | s | C7a |
| 138,36 | s | C5 |
| 134,97 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 165,4$ Hz | C6 |
| 121,67 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 166,8$ Hz | C4 |
| 117,73 | s | C3a |
| 112,12 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 168,3$ Hz | C7 |

4.1.14 Indirubin-5-sulfonamid (**72**)



Indirubin-5-sulfonamid (**72**) wird aus Isatin-5-sulfonamid und Indoxylacetat synthetisiert. Mit geringer Ausbeute wird es nach säulenchromatographischer Aufreinigung als ein schwarzes Pulver erhalten. Eine Verunreinigung mit Indigo (8 Massen-%, ^1H -NMR) konnte nicht entfernt werden. Da die Verunreinigung charakterisiert werden konnte und Indigo in allen Testsystemen inaktiv war, war es akzeptabel, für ein erstes *Screening* Indirubin-5-sulfonamid in dieser geringen Reinheitsstufe einzusetzen.

Im ^1H -NMR-Spektrum verändern sich im Vergleich zum Spektrum von Indirubin-5-sulfonat (Kapitel 4.1.10) vor allem die Signale des ungestrichenen Systems. Mit Tieffeldshifts von +0,18 ppm für C4H, +0,12 ppm für C6H und +0,21 ppm für C7H entsprechen diese Veränderungen denjenigen beim Übergang von Isatin-5-sulfonat zu Isatin-5-sulfonamid (Kapitel 4.1.13).

Bei 7,23 ppm tritt die NH_2 -Gruppe in Resonanz. Nach Zugabe von D_2O zur Meßprobe verschwindet dieses Signal (Abb. 47).

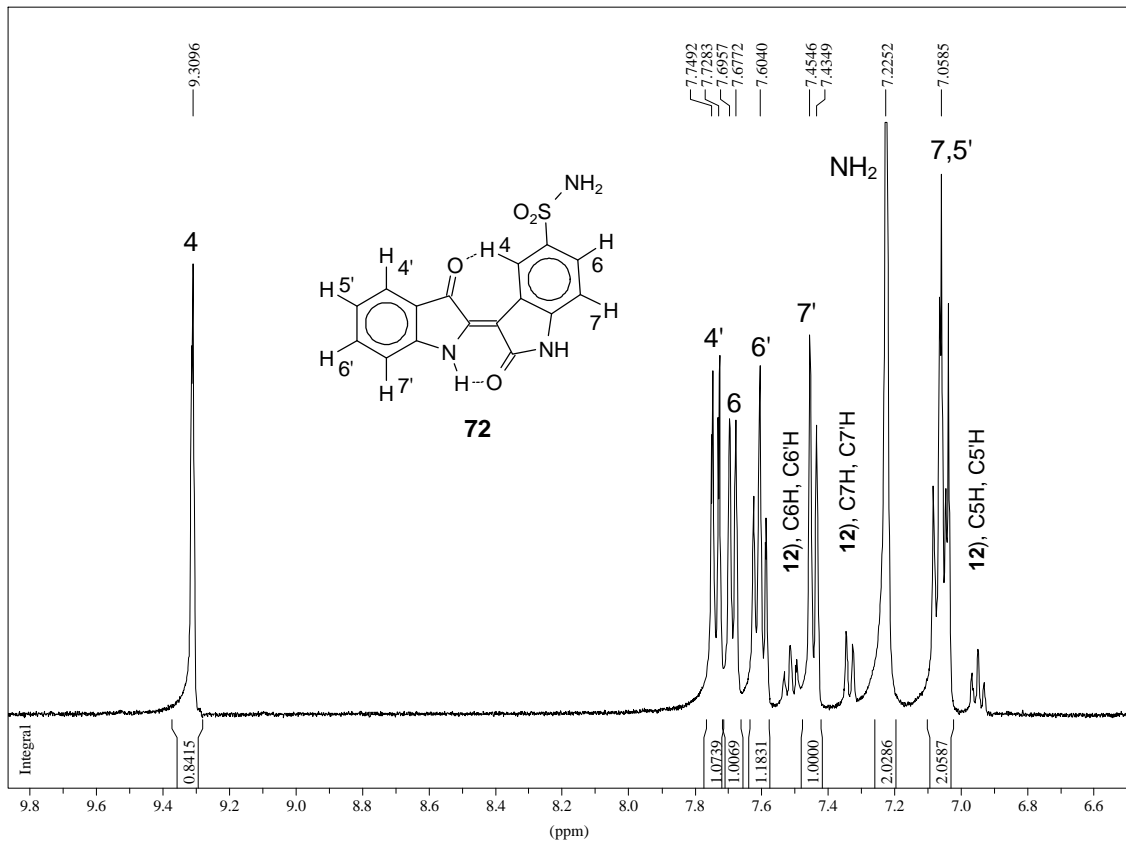


Abb. 46: ^1H -NMR-Spektrum von **72**, Bereich der CH-Signale, der Indigoanteil beträgt 8 Massen-%.

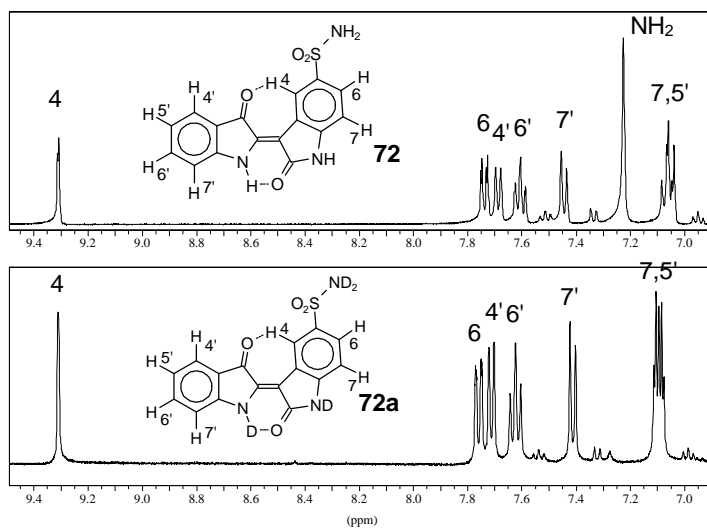


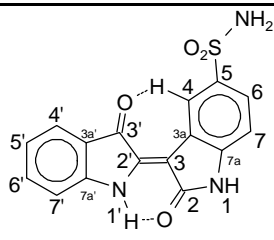
Abb. 47: ^1H -NMR-Spektrum von **72**; oben: ohne D_2O ; unten: mit D_2O , das NH_2 -Signal verschwindet

Tab. 26: Signallage und Kopplungen im ^1H -NMR-Spektrum von **72**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|-----------------|
| 11,25 und 11,15 | 2 s | N1H, N1'H |
| 9,31 | s | C4H |
| 7,74 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,1$ Hz | C4'H |
| 7,69 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,4$ Hz | C6H |
| 7,60 | pt | C6'H |
| 7,44 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,9$ Hz | C7'H |
| 7,23 | s | NH ₂ |
| 7,08 - 7,04 | m | C7H, C5'H |

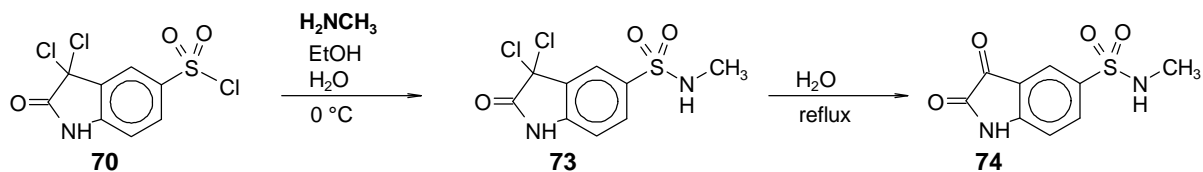
Wie bereits beim Übergang von Isatin-5-sulfonat (**27**) (Spektren siehe Anhang, Kapitel

8.1.4) zu Isatin-5-sulfonamid (Kapitel 4.1.13) beobachtet, ändern sich die meisten Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum nicht wesentlich im Vergleich zum Spektrum von Indirubin-5-sulfonat (Kapitel 4.1.10). Selbst an der Substitutionsstelle findet nur ein Hochfeldshift von -1,21 ppm statt (vgl. bei den beiden analogen Isatinderivaten **27** und **71**: -4,67 ppm). C7a wird das Signal bei 142,99 ppm zugeordnet. Damit erfährt C7a von Indirubin-5-sulfonat ausgehend einen Tieffeldshift von etwa +2 ppm. Dies entspricht den Verhältnissen bei den analogen Isatinderivaten.

Tab. 27: Signallage und Kopplungen im ^{13}C -NMR-Spektrum von **72**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|----------------------------------|-----------|
| 188,52 | s | C3' |
| 170,98 | s | C2 |
| 152,45 | s | C2' |
| 142,99 | s | C7a |
| 139,32 | s | C7a' |
| 137,24 | s | C5 |
| 137,24 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 160,5$ Hz | C6' |
| 126,98 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 159,2$ Hz | C4 |
| 124,44 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 164,5$ Hz | C4' |
| 122,27 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 169,8$ Hz | C6 |
| 121,72 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 165,2$ Hz | C5' |
| 121,13 | s | C3a |
| 119,01 | s | C3a' |
| 113,56 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 159,9$ Hz | C7' |
| 109,22 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 165,2$ Hz | C7 |
| 104,92 | s | C3 |

4.1.15 Isatin-5-sulfonsäuremethyamid (**74**)



Die Reaktion wird in Anlehnung an eine Vorschrift von Haller (1938 b) durchgeführt. Aus 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonylchlorid und Methylamin wird in wäßriger Lösung zunächst 3,3-Dichlor-2-oxindol-5-sulfonsäuremethyamid (**73**) dargestellt. Dieses wird in siedendem Wasser zu Isatin-5-sulfonsäuremethyamid (**74**) hydrolysiert, das in Form gelber Kristallen in guter Ausbeute anfällt.

Im ^1H -NMR-Spektrum verändert sich die Lage der aromatischen Signale nur minimal im Vergleich zur nichtmethylierten Verbindung. Das Sulfonamid-Proton tritt ebenfalls im aromatischen Bereich in Resonanz (7,48 ppm). Es erscheint aufgrund einer $^3J_{\text{H,H}}$ -Kopplung mit der Methylgruppe als Quartett. Entsprechend spaltet die Methylgruppe bei 2,41 ppm in ein Dublett auf (**Abb. 48**). Die Kopplungskonstante beträgt 5,0 Hz und liegt damit im typischen Bereich für $^3J(\text{CH-NH})$ -Kopplungen.

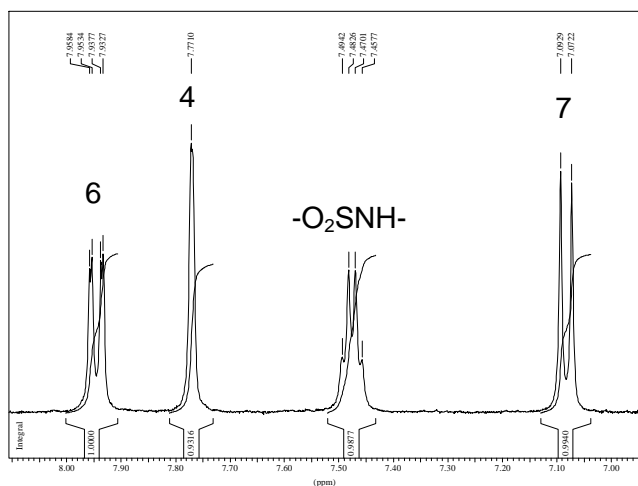
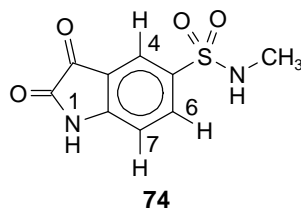


Abb. 48: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **74**, aromatischer Bereich

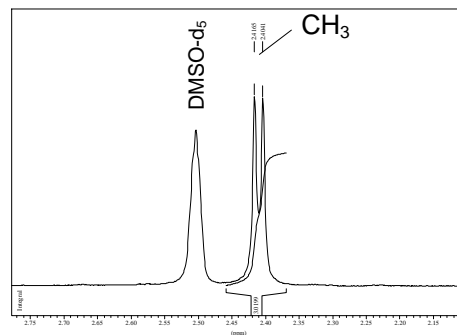


Abb. 49: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **74**, Signal der Methylgruppe

Tab. 28: Signallage und Kopplungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **74**.

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|-----------------|
| 11,42 | s | N1H |
| 7,95 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,3$ Hz | C6 |
| 7,77 | s | C4 |
| 7,48 | q, $^3J_{\text{H,H}} = 5,0$ Hz | NH ₂ |
| 7,08 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,3$ Hz | C7 |
| 2,41 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 5,0$ Hz | CH ₃ |

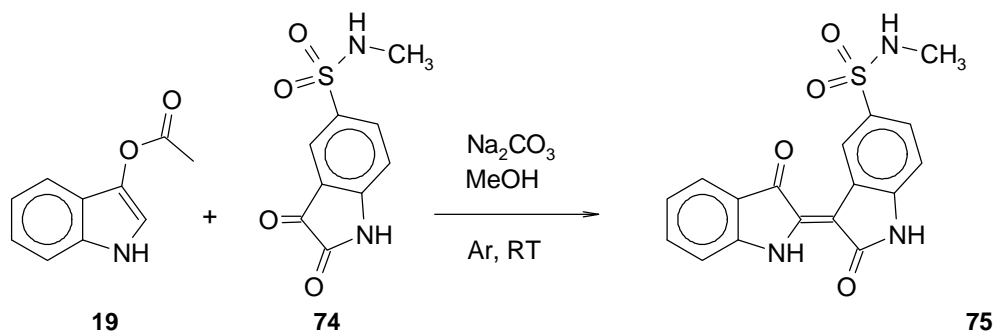
Eine signifikante Änderung des $^{13}\text{C-NMR-Spektrums}$ im Vergleich zum nichtmethylierten Isatinderivat findet nur in der *ipso*-Position statt: C5 tritt um $-5,23$ ppm hochfeldverschoben bei 133,13 ppm in Resonanz. Das Methylkohlenstoffatom erscheint als Quartett bei 28,52 ppm.

Tab. 29: Signallage und Kopplungen im ^{13}C -NMR-Spektrum von **74**

74

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|----------------------------------|---------------|
| 183,04 | s | C3 |
| 159,44 | s | C2 |
| 153,44 | s | C7a |
| 133,13 | s | C5 |
| 136,15 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 166,0$ Hz | C6 |
| 122,48 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 169,2$ Hz | C4 |
| 118,04 | s | C3a |
| 112,40 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 168,9$ Hz | C7 |
| 28,52 | q, $^1J_{\text{C,H}} = 139,2$ Hz | CH_3 |

4.1.16 Indirubin-5-sulfonsäuremethylamid (**75**)



Indirubin-5-sulfonsäuremethylamid (**75**) wird aus Isatin-5-sulfonsäuremethylamid und Indoxylacetat synthetisiert. Es fällt nach dem Waschen und Trocknen in sehr guten Ausbeuten als violettes Pulver an, das nicht weiter aufgereinigt werden muß.

Im ^1H -NMR-Spektrum erfahren die Signale der aromatischen Protonen nur geringe Veränderungen im Vergleich zum nichtmethylierten Indirubin-5-sulfonamid. Bei 2,46 ppm tritt die Methylgruppe als Dublett in Resonanz. Die Kopplung mit der Sulfonamidgruppe ist auch im Quartett des Sulfonamidprotons (7,32 ppm) erkennbar. Versetzt man die NMR-Probe mit D_2O (**Abb. 50**), so verschwinden die Signale des Sulfonamid-Protons, der beiden NH-Protonen und das Methylsignal wird zu einem Singulett.

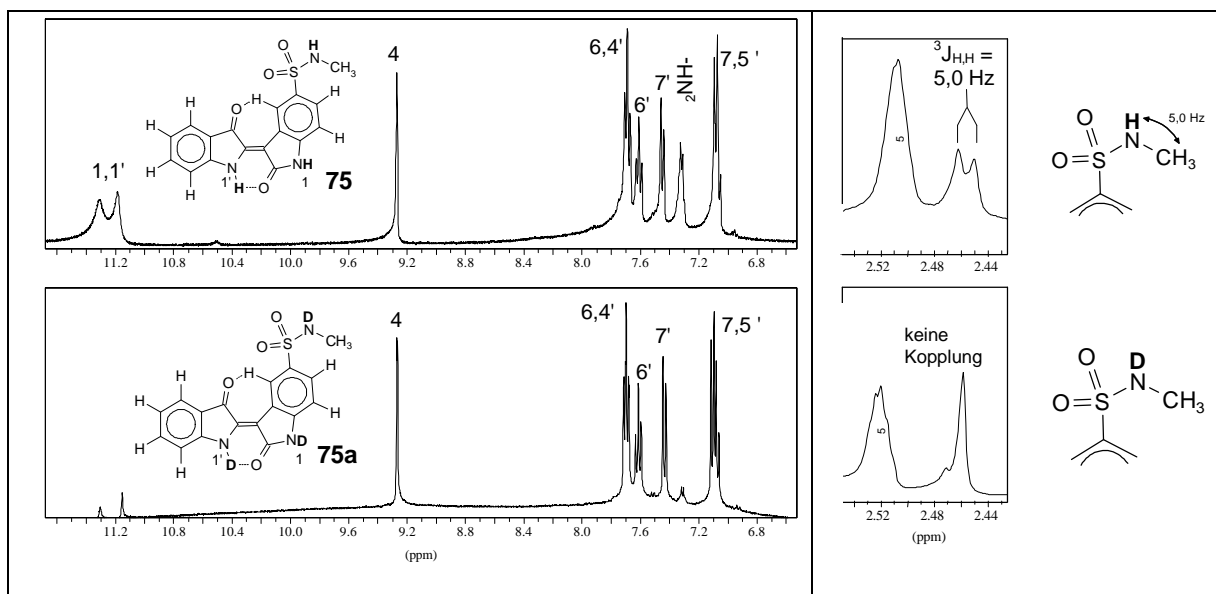
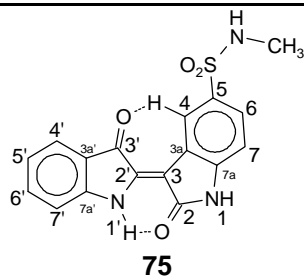


Abb. 50: Ausschnitte aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **75**: links oben: aromatischer Bereich ohne D_2O ; links unten: aromatischer Bereich mit D_2O , das NH_2 -Signal verschwindet; mitte oben: Signal der Methylgruppe ohne D_2O , die $^3J_{\text{H,H}}$ -Kopplung zwischen Methylprotonen und dem NH -Proton beträgt 5,0 Hz; mitte unten: Signal der Methylgruppe mit D_2O , die Kopplung mit dem NH -Proton verschwindet.

Tab. 30: Signallage und Kopplungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **75**

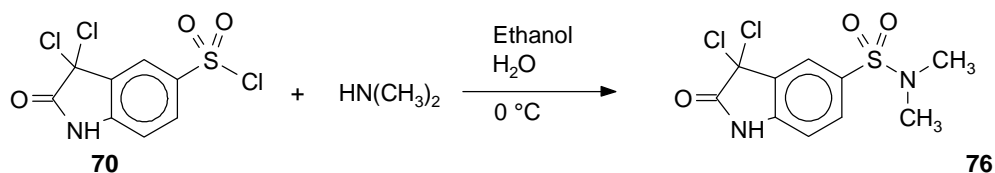
| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--|----------------------|
| 11,30 und 11,18 | 2 s | N1H, N1'H |
| 9,27 | s | C4H |
| 7,71 - 7,67 | m | C6H und C4' |
| 7,61 | m | C6'H |
| 7,45 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,3 \text{ Hz}$ | C7'H |
| 7,32 | q _{verbreitert} | NH |
| 7,09 - 7,05 | m | C7H, C5'H |
| 2,46 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 5,0 \text{ Hz}$ | CH_3 |

Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum erfährt C5 einen Hochfeldshift von -5,31 ppm im Vergleich zu Indirubin-5-sulfonamid, wahrscheinlich aufgrund des +I-Effektes der Methylgruppe; ein Effekt wie er auch bei den entsprechenden Isatinderivaten beobachtet wird. Die anderen Signale erfahren nur sehr geringe Änderungen. Die Methylgruppe kommt bei 28,65 ppm zur Resonanz.

Tab. 31: Signallage und Kopplungen im ^{13}C -NMR-Spektrum von **75**

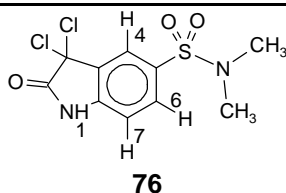
| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|----------------------------------|-----------------|
| 188,68 | s | C3' |
| 170,85 | s | C2 |
| 152,45 | s | C2' |
| 143,36 | s | C7a |
| 139,43 | s | C7a' |
| 137,28 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 160,6$ Hz | C6' |
| 131,93 | s | C5 |
| 127,61 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 165,7$ Hz | C4 |
| 124,50 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 159,8$ Hz | C4' |
| 123,13 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 164,5$ Hz | C6 |
| 121,73 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 171,0$ Hz | C5' |
| 121,42 | s | C3a |
| 118,90 | s | C3a' |
| 113,58 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 165,7$ Hz | C7' |
| 109,41 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 165,7$ Hz | C7 |
| 104,48 | s | C3 |
| 28,65 | q, $^1J_{\text{C,H}} = 138,7$ Hz | CH ₃ |

4.1.17 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonsäure(dimethyl)amid (**76**)



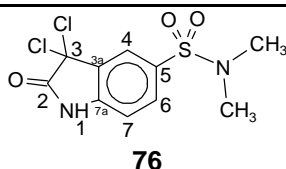
Die Reaktion wird nach Haller (1938 b) durchgeführt. 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonsäure(dimethyl)amid (**76**) wird aus 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonylchlorid in einer ethanolisch/wässrigen Dimethylaminlösung synthetisiert. Das in mäßiger Ausbeute entstehende, hellgelbe Pulver kann direkt weiter zum entsprechenden Isatinderivat umgesetzt werden.

Die Signale im ^1H -NMR-Spektrum unterscheiden sich nur minimal von jenen in den entsprechenden Isatinderivaten.

Tab. 32: Signallage und Kopplungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **76**

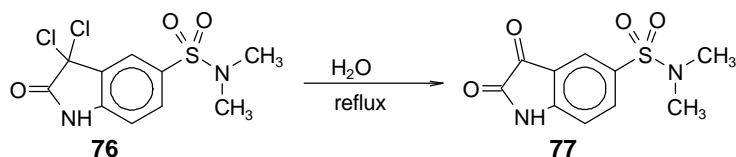
| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|---------------------|
| 11,88 | s | N1H |
| 7,93 | s | C4 |
| 7,82 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,3$ Hz | C6 |
| 7,22 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,3$ Hz | C7 |
| 2,62 | s | 2 x CH ₃ |

Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum erscheint im charakteristischen Bereich für aliphatische, zwei Chloratome tragende Kohlenstoffatome C3 bei 73,64 ppm. C3a tritt im Vergleich zu den Isatinderivaten um etwa +10 ppm tieffeldverschoben in Resonanz. Die anderen Signale liegen in Bereichen, wie sie auch für die Isatine gefunden werden.

Tab. 33: Signallage und Kopplungen im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von **76**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-------------------|----------------------------------|---------------------|
| 168,97 | s | C2 |
| 143,22 | s | C7a |
| 132,46 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 166,4$ Hz | C6 |
| 129,64 und 129,42 | 2 s | C3a, C5 |
| 123,77 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 167,8$ Hz | C4 |
| 112,09 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 169,9$ Hz | C7 |
| 73,64 | s | C3 |
| 37,48 | q, $^1J_{\text{C,H}} = 139,1$ Hz | 2 x CH ₃ |

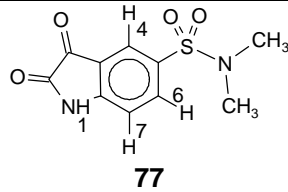
4.1.18 Isatin-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid (**77**)



Die Reaktion wird nach Haller (1938 b) durchgeführt. Isatin-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid (**77**) wird durch Hydrolyse von 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid in siedendem Wasser dargestellt. Es fällt in guten Ausbauten als orangefarbener, kristalliner Stoff an.

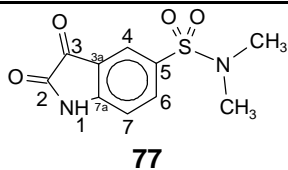
Das $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ zeigt nahezu die gleiche Signallage, wie jenes der entsprechenden Monomethylverbindung. Die NH-Resonanz ist verschwunden. Das Methylsignal zeigt im Integral sechs Protonen und kommt um +0,21 ppm tieffeldverschoben zur Resonanz.

Tab. 34: Signallage und Kopplungen im $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ von **77**



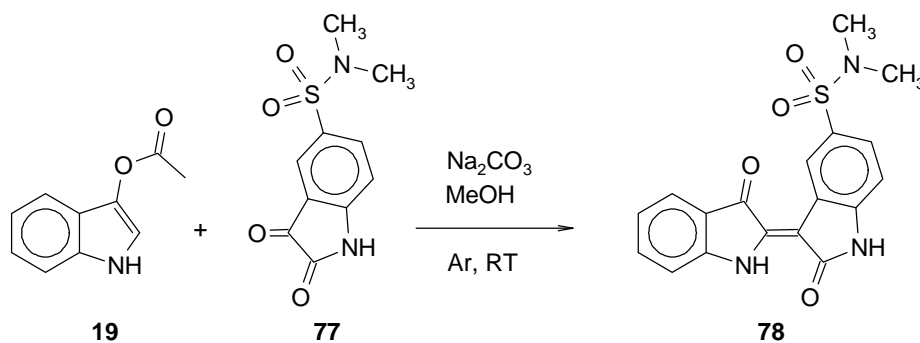
| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|---------------------|
| 11,47 | s | N1H |
| 7,94 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,2$ Hz | C6H |
| 7,71 | s | C4H |
| 7,12 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,2$ Hz | C7H |
| 2,62 | s | 2 x CH ₃ |

Das $^{13}\text{C-NMR-Spektrum}$ unterscheidet sich kaum von jenem der entsprechenden Monomethylverbindung, nur das Signal des Kohlenstoffatoms C5 ist um -4,51 ppm hochfeldverschoben und die Methylgruppen treten erwartungsgemäß etwas tieffeldverschoben (+8,96 ppm) in Resonanz.

Tab. 35: Signallage und Kopplungen im ^{13}C -NMR-Spektrum von **77**

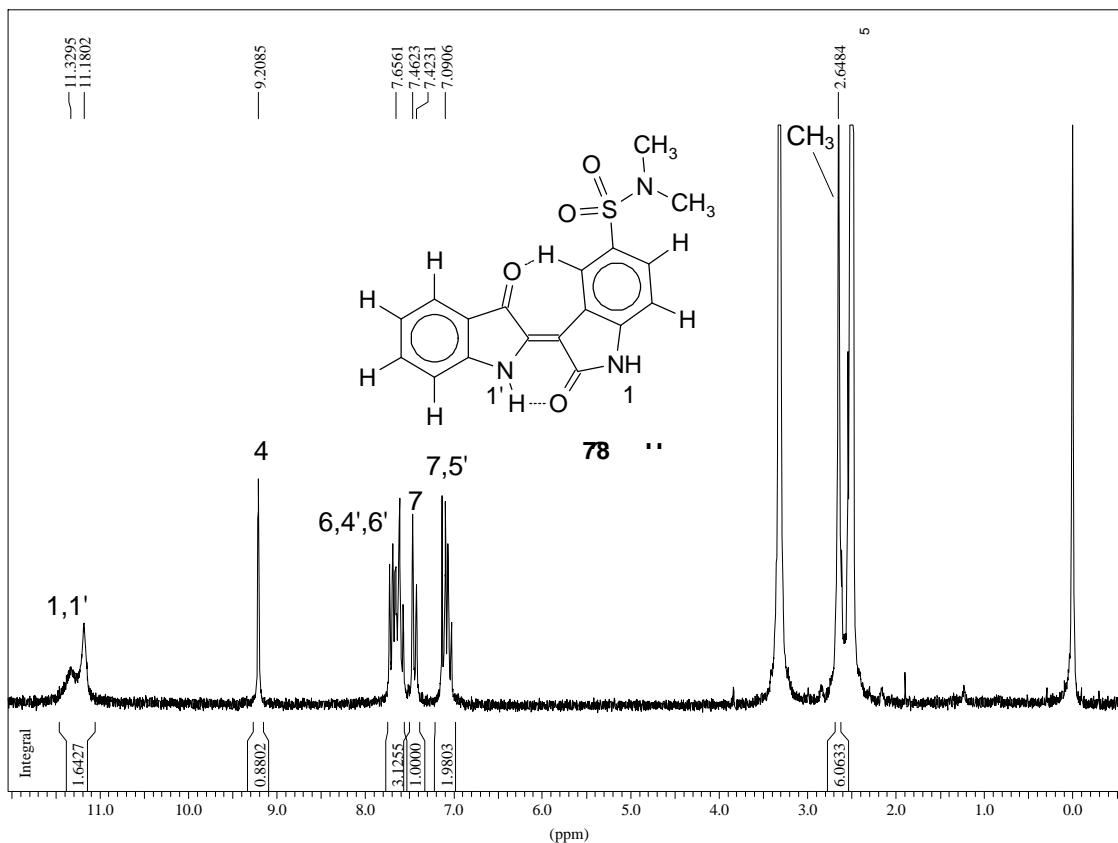
| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|-----------------------------------|-------------------|
| 182,89 | s | C3 |
| 159,37 | s | C2 |
| 153,60 | s | C7a |
| 136,98 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 167,32$ Hz | C6 |
| 128,62 | s | C5 |
| 123,27 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 169,2$ Hz | C4 |
| 118,05 | s | C3a |
| 112,68 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 169,2$ Hz | C7 |
| 37,48 | q, $^1J_{\text{C,H}} = 140,1$ Hz | 2 x CH_3 |

4.1.19 Indirubin-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid (**78**)



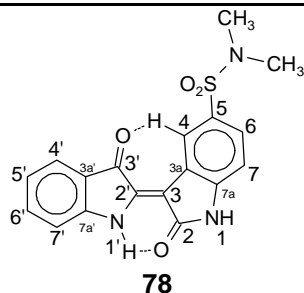
Indirubin-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid (**78**) wird aus Isatin-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid und Indolylacetat synthetisiert. Die Aufreinigung erfolgt durch Ausfällen aus DMSO mit Wasser und Kochsalzlösung. Indirubin-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid fällt dabei in guten Ausbeuten als violettes Pulver an.

Im ^1H -NMR-Spektrum finden im Vergleich zur entsprechenden monomethylierten Verbindung die gleichen geringen Verschiebungen statt, die beim Übergang von Isatin-5-sulfonsäuremethylamid zu Isatin-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid beobachtet wurden. Dies führt zu zahlreichen Überlagerungen, so daß nur noch die Signale des C4-Protons und des C7'-Protons getrennt beobachtet werden können. Das Signal der sechs Methylprotonen erscheint bei 2,65 ppm.

Abb. 51: ^1H -NMR-Spektrum von **78**Tab. 36: Signallage und Kopplung im ^1H -NMR-Spektrum von **78**

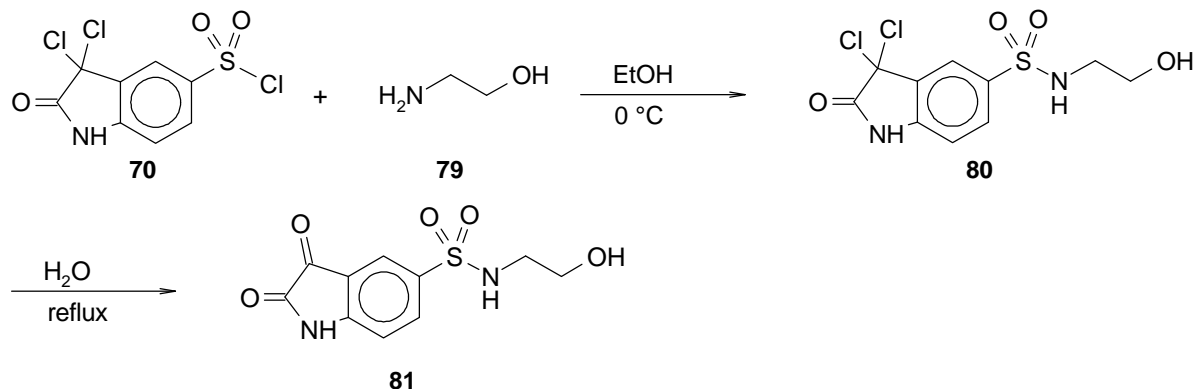
| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|---------------------|
| 11,33 und 11,18 | 2 s | N1H, N1'H |
| 9,21 | s | C4H |
| 7,72 - 7,57 | m | C6H, C4'H, C6'H |
| 7,44 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,1$ Hz | C7'H |
| 7,13 - 7,02 | m | C7H, C5'H |
| 2,65 | s | 2 x CH ₃ |

Das ^{13}C -NMR-Spektrum unterscheidet sich kaum von jenem der entsprechenden Monomethyl-Verbindung, nur das Signal des Kohlenstoffatoms C5 ist um -4,29 ppm hochfeldverschoben und die Methylgruppen treten erwartungsgemäß etwas tieffeldverschoben (+8,55 ppm) in Resonanz.

Tab. 37: Signallage und -formen im ^{13}C -NMR-Spektrum von **78**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|----------------------------------|-----------------|
| 188,37 | s | C3' |
| 170,51 | s | C2 |
| 152,10 | s | C2' |
| 143,53 | s | C7a |
| 139,34 | s | C7a' |
| 136,93 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 164,4$ Hz | C6' |
| 128,06 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 166,5$ Hz | C4 |
| 127,64 | s | C5 |
| 124,22 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 163,7$ Hz | C4' |
| 123,18 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 172,0$ Hz | C6 |
| 121,48 | s | C3a |
| 118,71 | s | C3a' |
| 121,36 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 165,1$ Hz | C5' |
| 113,22 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 167,2$ Hz | C7' |
| 109,11 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 165,8$ Hz | C7 |
| 104,16 | s | C3 |
| 37,20 | q, $^1J_{\text{C,H}} = 139,4$ Hz | CH ₃ |

4.1.20 Isatin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid (**81**)



In ethanolischer Lösung reagiert zunächst 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonylchlorid mit 2-Aminoethanol (Ethanolamin) (**79**) zu 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid (**80**). Nach Ansäuern mit Salzsäure wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand direkt in siedendem Wasser hydrolysiert. Nach dem Abkühlen bei 4 °C scheidet sich Isatin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid (**81**) in Form gelber Kristalle in guten Ausbeuten ab. Die Reaktion wird in Anlehnung an eine Vorschrift von Haller (1938 b) durchgeführt.

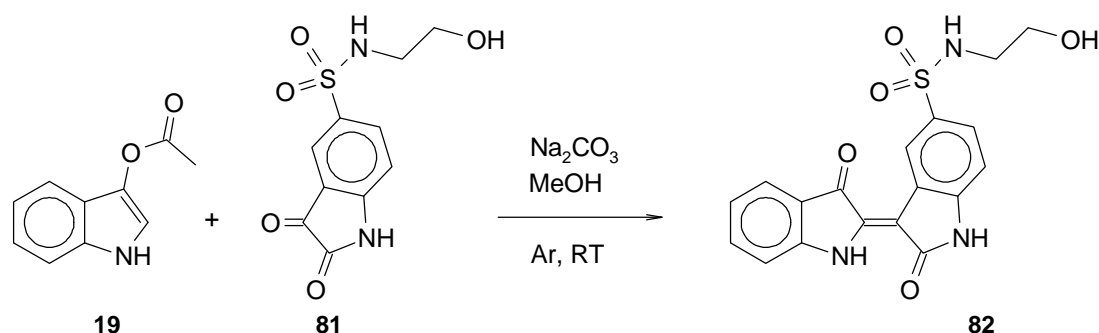
Die Signale der drei aromatischen CH-Protonen und des aromatischen NH-Protons im $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ sind gegenüber Isatin-5-sulfonsäuremethyleamid nicht verändert. Das Sulfonamid-Proton tritt ebenfalls an gleicher Stelle in Resonanz, jedoch aufgrund der Kopplung mit der benachbarten Methylengruppe als Triplett. Das Triplett bei 3,38 ppm ist der hydroxylierten Methylengruppe zuzuordnen. Das Multiplett bei 2,78 ppm ist der Methylengruppe am amidischen NH zuzuordnen. Das theoretisch zu erwartende Doppeltriplett, das durch die Überlagerung der Kopplung mit den Protonen der anderen Methylengruppe und der Kopplung mit dem amidischen NH-Proton entstehen sollte, ist nicht aufgelöst. Das Proton der Hydroxygruppe wird nicht beobachtet und liegt vermutlich verbreitert unter der breiten HDO-Resonanz.

Tab. 38: Signallage und Kopplungen im $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ von **81**

81

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|----------------------|
| 11,42 | s | N1H |
| 7,96 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,4$ Hz | C6 |
| 7,81 | s | C4 |
| 7,66 | t, $^3J_{\text{H,H}} = 5,7$ Hz | -SO ₂ -NH |
| 7,07 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,6$ Hz | C7 |
| 3,38 | t, $^3J_{\text{H,H}} = 6,1$ Hz | -CH ₂ -O- |
| 2,82 - 2,73 | m | -N-CH ₂ - |

4.1.21 Indirubin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid (**82**)



Indirubin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid (**82**) wird aus Isatin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid und Indoxylacetat synthetisiert und fällt in sehr guten Ausbuten als violetteres Pulver an, das nicht weiter aufgereinigt werden muß.

Im $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ zeigen die Signale der aromatischen Protonen keine Veränderung im Vergleich zum Spektrum der analogen monomethylierten Verbindung Indirubin-5-sulfonsäuremethyleamid. Das Signal des Sulfonamid-Protons tritt zusammen mit dem C7'-Proton in

Resonanz. Bei Zugabe von D₂O zur Meßprobe verringert sich das Integral des entsprechenden Signals von 2H auf 1H, und es entsteht ein scharfes Dublett. Das Hydroxyproton kommt bei 4,47 ppm als Triplet zur Resonanz. Das Signal der benachbarten Methylengruppe wird vom Wassersignal (HDO) überlagert, ist aber an dessen linkem Rand gerade noch erkennbar. Die Methylengruppe am Amidstickstoff tritt als verbreitertes Doppeltriplett auf; die Kopplungskonstante der Kopplung mit den anderen Methylenprotonen kann nach Eliminierung der (CH₂-NH)-Kopplung durch Zugabe von D₂O bestimmt werden.

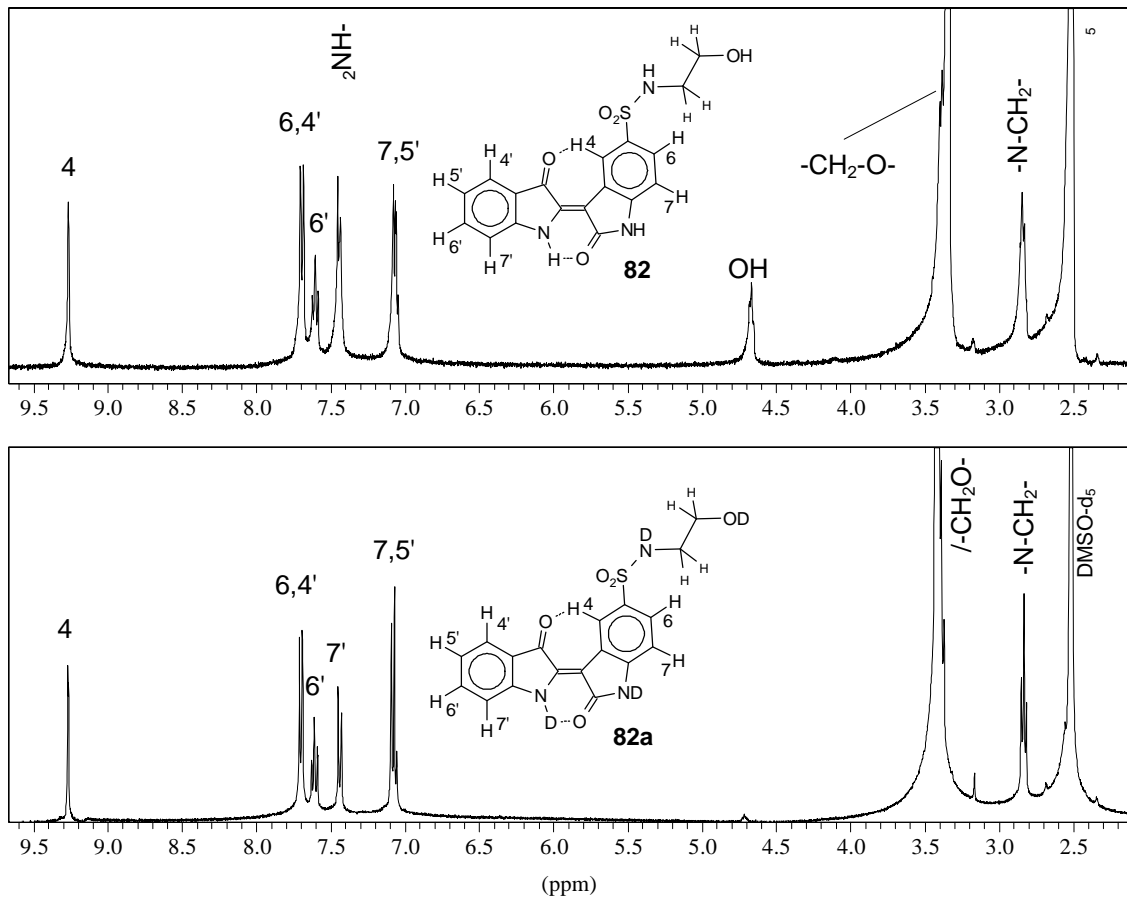


Abb. 52: Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum von **82**; oben: ohne D₂O; unten: mit D₂O, das NH₂-Signal und das OH-Signal verschwinden.

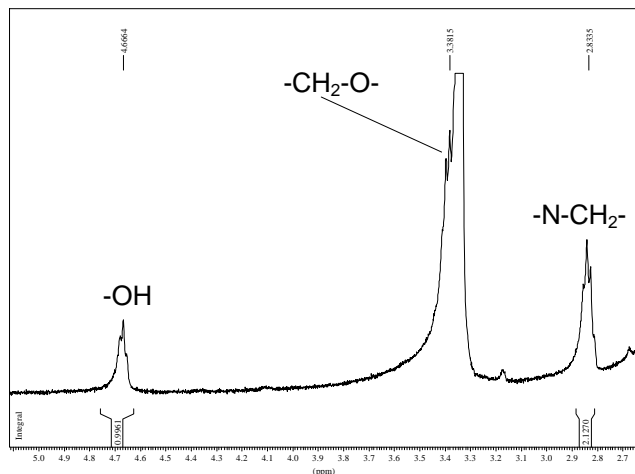


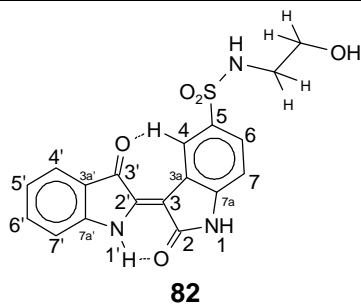
Abb. 53: Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **82**; aliphatischer Bereich, am linken Rand des HDO-Peaks ist gerade noch das Signal der Hydroxymethylengruppe zu erkennen.

Tab. 39: Signallage und Kopplungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **82**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|---|--------------------------------------|
| 11,29 und 11,18 | 2 s | N1H, N1'H |
| 9,27 | s | C4H |
| 7,71 - 7,69 | m | C6H, C4' |
| 7,61 | pt | C6'H |
| 7,46 - 7,43 | m (7,44; d, $^3J\{\text{C7'H}, \text{C6'H}\} = 8,1$ Hz) ¹⁾ | C7'H und -SO ₂ -NH- |
| 7,07 | m | C7H, C5'H |
| 4,67 | t, $^3J_{\text{H,H}} = 4,6$ Hz | OH |
| 3,40 | (dt) ²⁾ | -CH ₂ -O |
| 2,84 | m (t, $^3J\{\text{CH}_2, \text{CH}_2\} = 6,5$ Hz) ¹⁾ | -N-CH ₂ - |

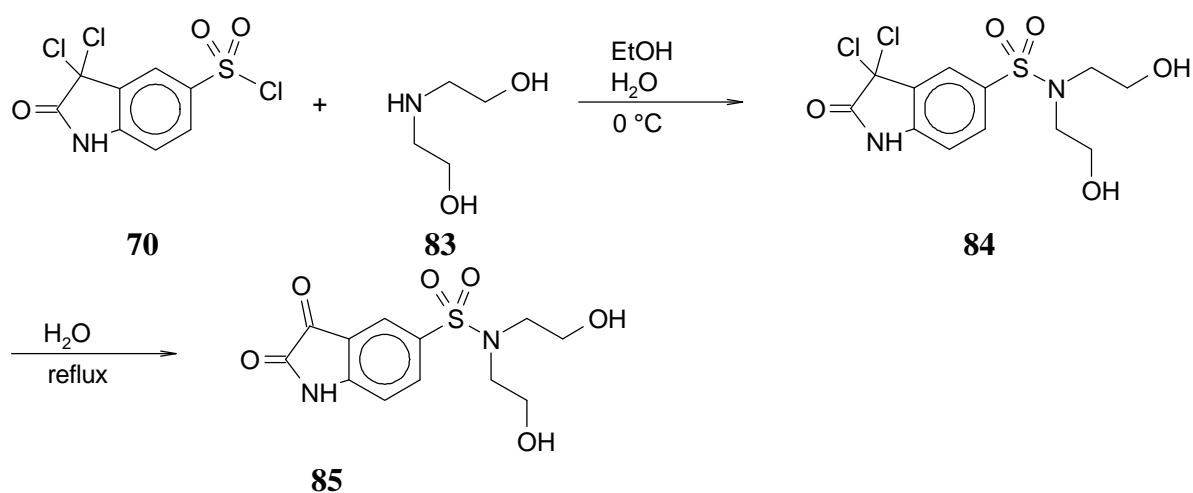
¹⁾Kopplung ist nach Zugabe von D₂O bestimmbar; ²⁾theoretisch zu erwartendes Doppeltriplett ist teilweise vom Wassersignal (HDO) überlagert.

Der Austausch einer Methylgruppe in Indirubin-5-sulfonsäuremethylamid durch eine 2-Hydroxyethylgruppe bewirkt im $^{13}\text{C-NMR-Spektrum}$ an den Signalen der aromatischen Kohlenstoffatome keine Veränderungen, mit Ausnahme von C5, das einen minimalen Tieffeldshift von +1,27 ppm erfährt. Die aliphatischen Kohlenstoffatome treten bei 59,85 ppm (-CH₂-OH) und 44,00 ppm (-NH-CH₂-) als Triplets in Resonanz.

Tab. 40: Signallage und -formen im ^{13}C -NMR-Spektrum von **82**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|----------------------------------|----------------------|
| 188,70 | s | C3' |
| 170,87 | s | C2 |
| 152,46 | s | C2' |
| 143,32 | s | C7a |
| 139,44 | s | C7a' |
| 137,29 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 163,4$ Hz | C6' |
| 133,20 | s | C5 |
| 127,53 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 165,9$ Hz | C4 |
| 124,52 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 159,6$ Hz | C4' |
| 122,95 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 162,4$ Hz | C6 |
| 121,74 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 164,0$ Hz | C5' |
| 121,36 | s | C3a |
| 118,92 | s | C3a' |
| 113,60 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 168,5$ Hz | C7' |
| 109,44 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 165,9$ Hz | C7 |
| 104,52 | s | C3 |
| 59,85 | t, $^1J_{\text{C,H}} = 141,1$ Hz | -CH ₂ -OH |
| 45,00 | t, $^1J_{\text{C,H}} = 138,0$ Hz | -NH-CH ₂ |

4.1.22 Isatin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid (**85**)

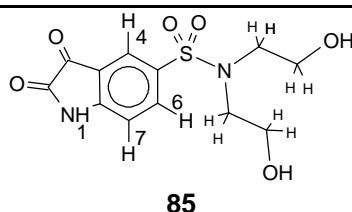


Aus 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonylchlorid und 2,2'-Iminodiethanol (Diethanolamin) (**83**) wird in einer wässrig/ethanolischen Lösung zunächst 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid (**84**) dargestellt und als Rohprodukt isoliert. Dieses wird in siedendem Wasser zu Isatin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid (**85**) hydrolysiert. Aus den entstehenden orangefarbenen

bis roten Hydrolysaten fällt Isatin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid (**85**) in guter Ausbeute in Form roter Kristalle aus. Die Reaktion wird in Anlehnung an eine Vorschrift von Haller (1938 b) durchgeführt.

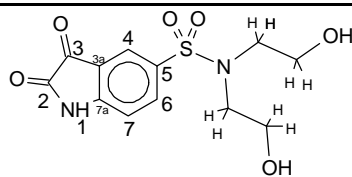
In den Signalen des $^1\text{H-NMR-Spektrums}$ von (**85**) finden im Vergleich zu Isatin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid keine Veränderungen in den Signallage statt. Lediglich die $-\text{SO}_2\text{NH}$ -Resonanz verschwindet, so daß die Kopplung der beiden Methylenprotonen in beiden aliphatischen Signalen deutlich erkennbar wird.

Tab. 41: Signallage und Kopplungen im $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ von **85**



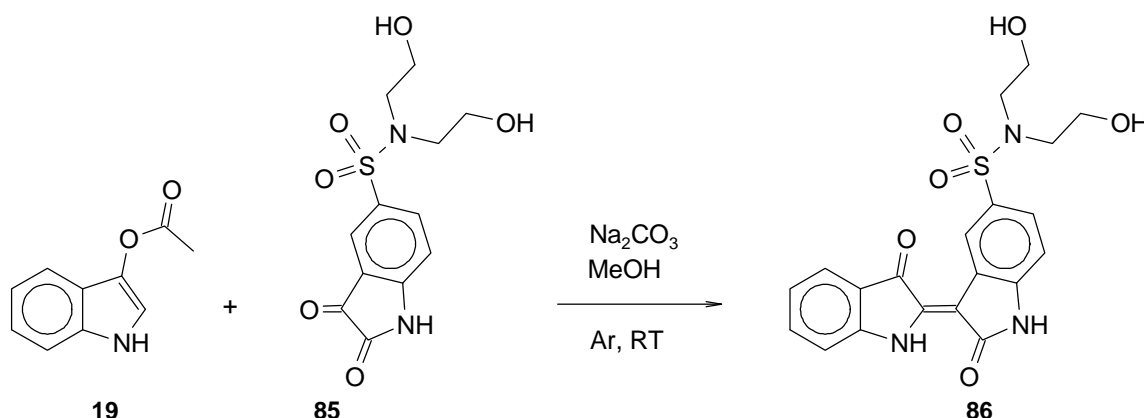
| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|------------------------------|
| 11,43 | s | N1H |
| 7,96 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,2$ Hz | C6 |
| 7,78 | s | C4 |
| 7,08 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,2$ Hz | C7 |
| 3,38 | t, $^3J_{\text{H,H}} = 6,2$ Hz | 2 x $-\text{CH}_2-\text{O}-$ |
| 2,78 | t, $^3J_{\text{H,H}} = 6,2$ Hz | 2 x $-\text{N}-\text{CH}_2-$ |

Im $^{13}\text{C-NMR-Spektrum}$ treten die Kohlenstoffatome des Isatingerüsts bei nahezu den gleichen δ -Werten in Resonanz wie bei der entsprechenden dimethylierten Verbindung. Lediglich das Kohlenstoffatom C5 erfährt einen leichten Tieffeldshift von +4,67 ppm durch den Austausch der zwei Methylgruppen gegen zwei 2-Hydroxyethylgruppen.

Tab. 42: Signallage und Kopplungen im ^{13}C -NMR-Spektrum von **85****85**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|----------------------------------|--------------------------|
| 182,95 | s | C3 |
| 159,37 | s | C2 |
| 153,28 | s | C7a |
| 136,44 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 166,4$ Hz | C6 |
| 133,29 | s | C5 |
| 122,78 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 169,3$ Hz | C4 |
| 117,91 | s | C3a |
| 112,57 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 168,6$ Hz | C7 |
| 59,64 | t, $^1J_{\text{C,H}} = 141,7$ Hz | 2 x -CH ₂ OH- |
| 50,73 | t, $^1J_{\text{C,H}} = 138,8$ Hz | 2 x -N-CH ₂ |

4.1.23 Indirubin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid (**86**)



Indirubin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid (**86**) wird aus Indoxylacetat und Indirubin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid (**85**) synthetisiert. Es fällt nach dem Waschen und Trocknen in sehr guten Ausbeuten als violettes Pulver an, das nicht weiter aufgereinigt werden muß.

Die aromatischen Signale im ^1H -NMR-Spektrum entsprechen jenen im ^1H -NMR-Spektrum der einfach hydroxyethylierten Verbindung. Unterschiede zeigen sich darin, daß das SO_2NH -Signal verschwunden ist, das OH-Signal als scharfes Triplet zu erkennen ist, das Signal der dem Sauerstoff benachbarten Methylengruppe um +0,16 ppm tieffeldverschoben ist und das Signal der dem Stickstoff benachbarten Methylengruppe um +0,36 ppm tieffeldverschoben ist.

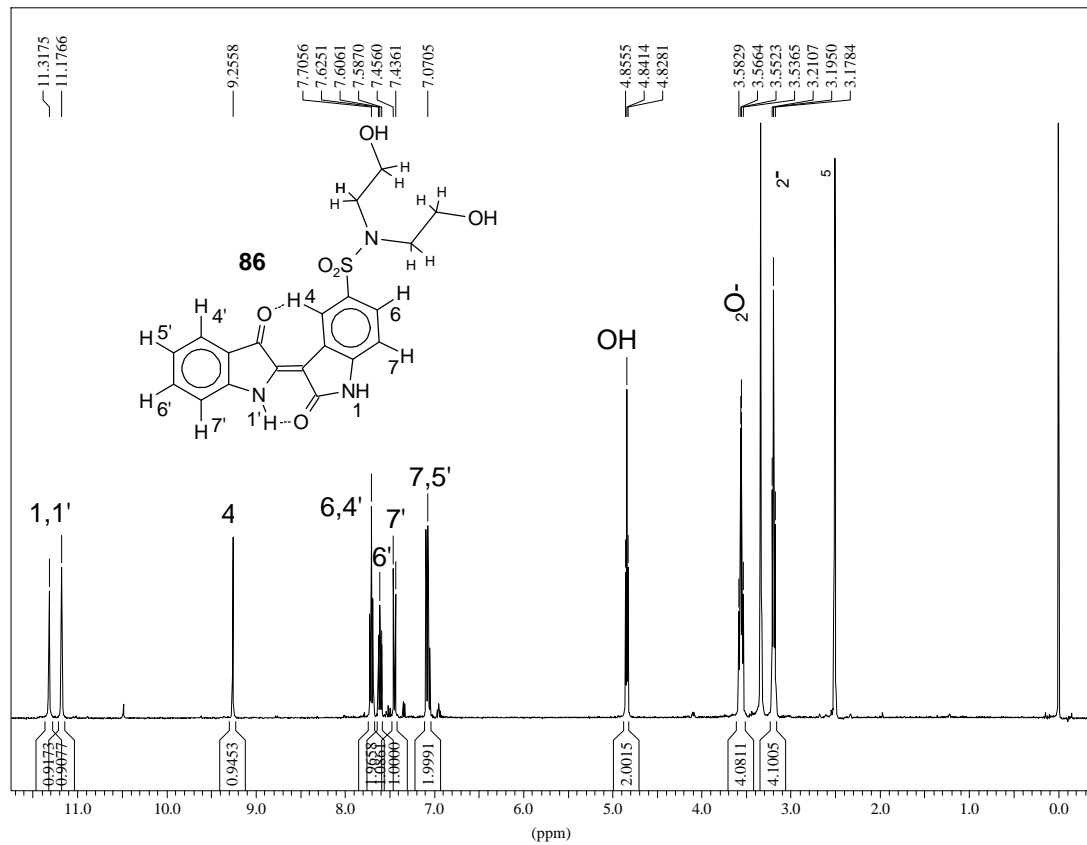


Abb. 54: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **86**.

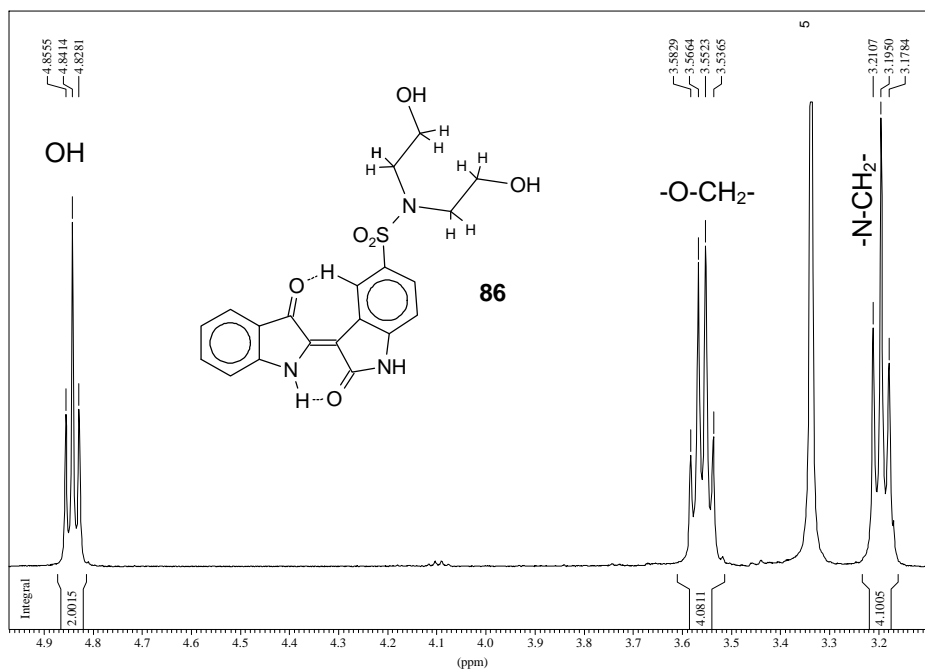
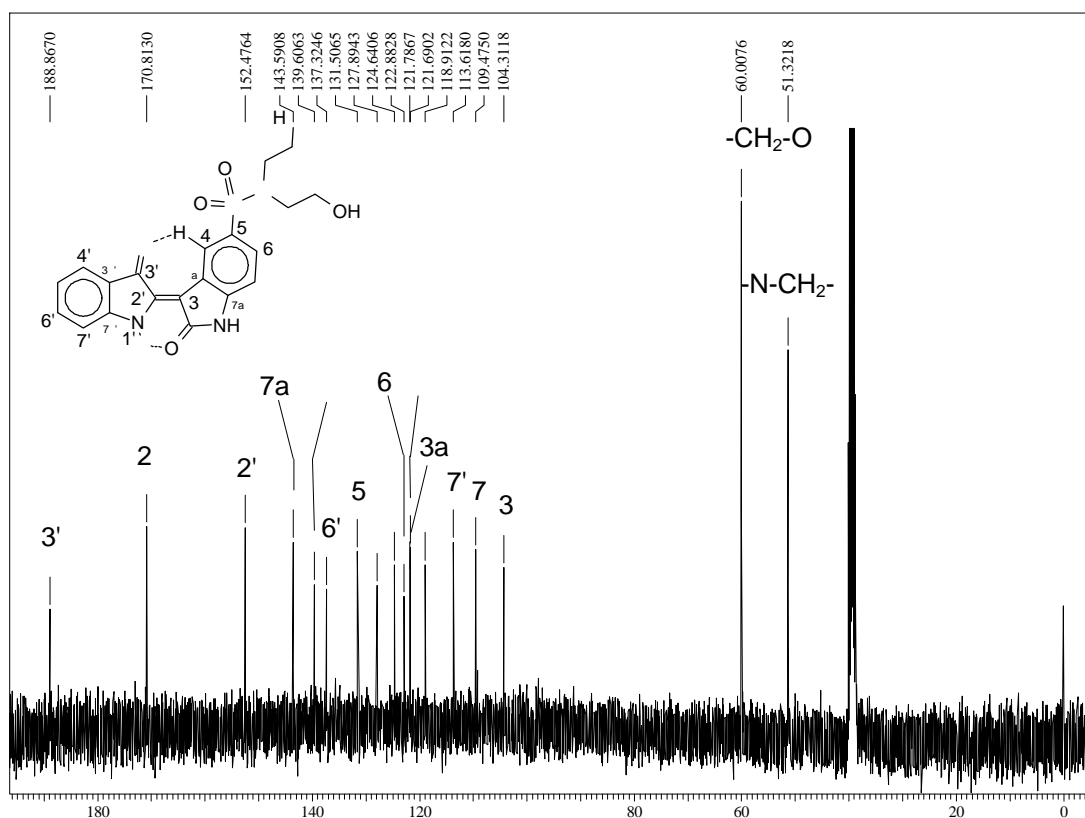


Abb. 55: Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **86**, aliphatischer Bereich.

Tab. 43: Signallage und Kopplungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **86**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|-------------------------|
| 11,32 und 11,18 | 2 s | N1H, N1'H |
| 9,26 | s | C4H |
| 7,72 - 7,68 | m | C6H, C4' |
| 7,61 | m | C6' |
| 7,45 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,0$ Hz | C7'H |
| 7,09 - 7,05 | m | C7H, C5'H |
| 4,84 | t, $^3J_{\text{H,H}} = 5,5$ Hz | 2 x -OH |
| 3,56 | m | 2 x -CH ₂ O- |
| 3,20 | $^3J_{\text{H,H}} = 6,5$ Hz | 2 x -N-CH ₂ |

Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum treten die Kohlenstoffatome des Indirubingerüsts bei nahezu den gleichen δ -Werten in Resonanz wie bei der entsprechenden dimethylierten Verbindung. Lediglich das Kohlenstoffatom C5 erfährt einen leichten Tieffeldshift von +3,87 ppm durch den Austausch der zwei Methylgruppen gegen zwei 2-Hydroxyethylgruppen. Im Vergleich zur einfach hydroxyethylierten Verbindung erfährt das Signal von C5 einen sehr geringen Hochfeldshift von -1,69 ppm.

Abb. 56: Protonenkoppeltes $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum von **86**.

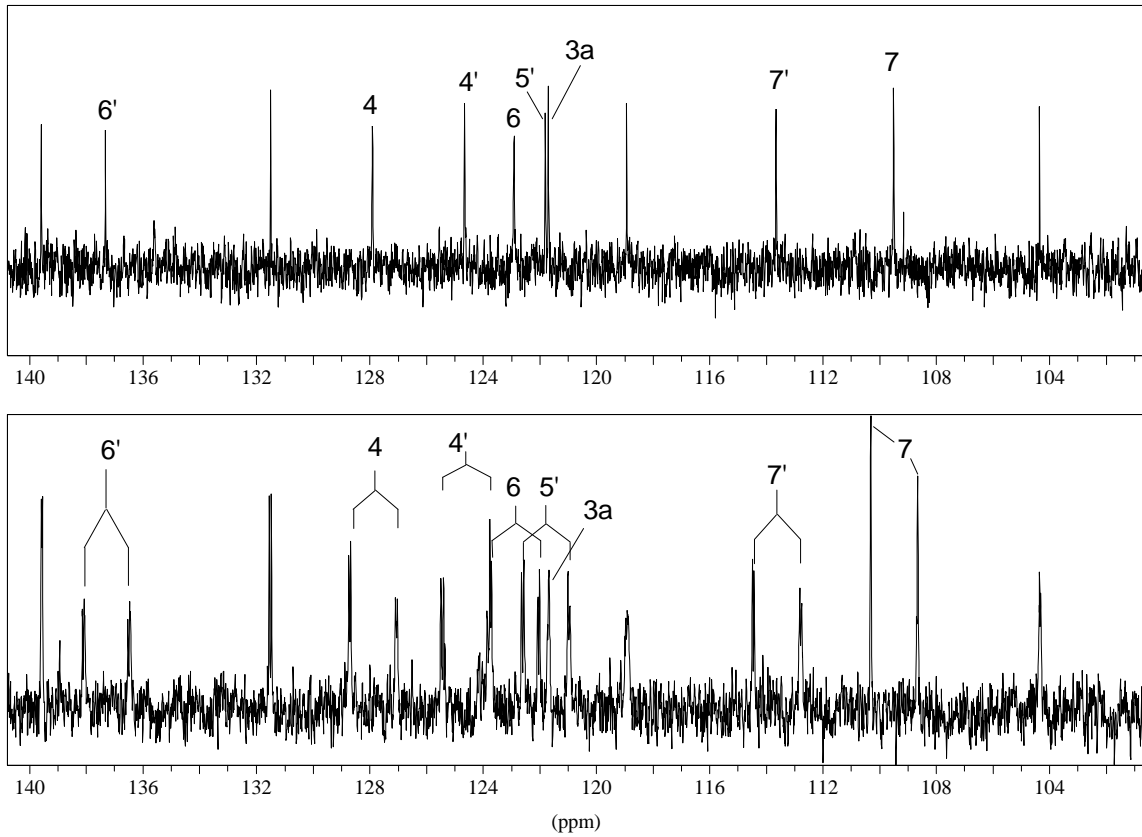
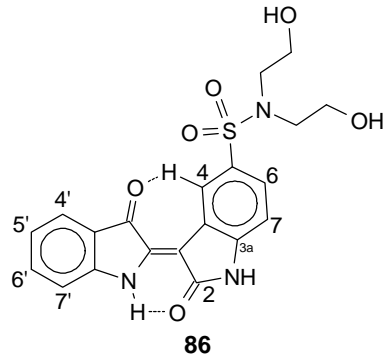
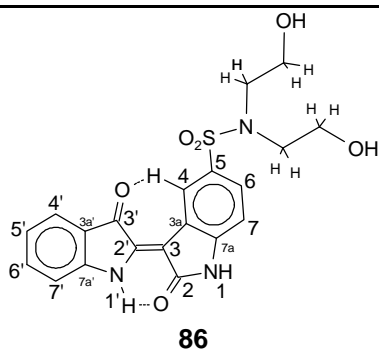
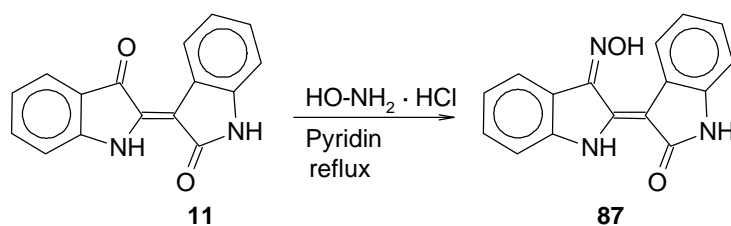


Abb. 57: ^{13}C -NMR-Spektrum von **86**, Bereich von 101 bis 141 ppm. gekennzeichnet sind die Signale der Wasserstoff tragenden Kohlenstoffatome, außerdem von C3a, das sehr nahe am Signal von C6/C5' liegt.

Tab. 44: Signallage und -Kopplungen im ^{13}C -NMR-Spektrum von **86**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|----------------------------------|--------------------------|
| 188,87 | s | C3' |
| 170,81 | s | C2 |
| 152,48 | s | C2' |
| 143,59 | s | C7a |
| 139,61 | s | C7a' |
| 137,32 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 160,1$ Hz | C6' |
| 131,51 | s | C5 |
| 127,98 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 165,2$ Hz | C4 |
| 124,64 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 162,7$ Hz | C4' |
| 122,88 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 162,4$ Hz | C6 |
| 121,79 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 164,0$ Hz | C5' |
| 121,69 | s | C3a |
| 118,91 | s | C3a' |
| 113,62 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 168,5$ Hz | C7' |
| 109,48 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 165,3$ Hz | C7 |
| 104,31 | s | C3 |
| 60,01 | t, $^1J_{\text{C,H}} = 141,0$ Hz | 2 x -CH ₂ -OH |
| 51,32 | t, $^1J_{\text{C,H}} = 135,0$ Hz | 2 x -NH-CH ₂ |

4.1.24 Indirubin-3'-oxim (**87**)

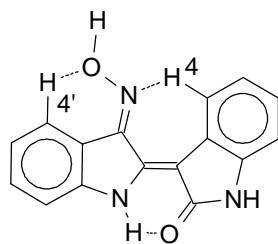


Die Synthese wird nach einer Patentschrift (Farbwerke vorm. Meister Lucius & Brüning, 1913) durchgeführt. Indirubin wird dabei mit Hydroxylaminhydrochlorid in Pyridin zum Sieden erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wird Indirubin-3'-oxim aus 1 n Salzsäure ausgefällt und zur weiteren Reinigung anschließend bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aus einer gesättigten ethanologischen Lösung mit Wasser ausgefällt; es fällt dabei in guter Ausbeute in Form roter Kristalle an.

Zur vollständigen Zuordnung der Signale im ^1H -NMR-Spektrum müssen neben dem ^1H -NMR-Spektrum von Indirubin (Anhang, Kapitel 8.1.1) auch die Spektren der beiden Derivate 5-Iodindirubin-3'-oxim (**91**) (Kapitel 4.1.25) und 3'-Hydroxyimimindirubin-5-sulfonsäure (Kapitel

4.1.26) in die Argumentation mit einbezogen werden. Es zeigt sich, daß im Vergleich zum unsubstituierten Indirubin keine großen Signalveränderungen stattfinden mit Ausnahme des Signals des Protons an C4'.

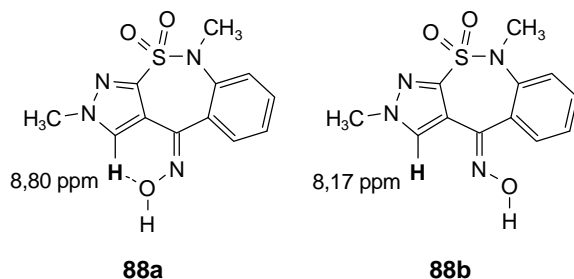
Dieses tritt bei 8,24 ppm in Resonanz, erfährt also im Vergleich zu Indirubin eine Tieffeldverschiebung von +0,59 ppm. Eine plausible Erklärung dafür ist die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung mit dem Oximsauerstoffatom (**Abb. 58**).



87

Abb. 58: Ausbildung zweier Wasserstoffbrückenbindungen in **87** zwischen dem Oximstickstoff und C4H sowie zwischen dem Oximsauerstoff und C4'H.

Eine derartige Tieffeldverschiebung durch eine Oximgruppe in entsprechender Konfiguration wurde auch von Vega und Díaz (1997) gefunden: In (*Z*) 4,9-Dihydro-2,9-dimethyl-10,10-dioxo-4-hydroximino-2H-pyrazol[3,4-c]-[2,1]benzothiazepin (**88a**) ist ein entschirmender Effekt durch das Sauerstoffatom einer Oximgruppe beobachtet worden (**Abb. 59**). Die Tieffeldverschiebung beträgt +0,63 ppm.



88a

88b

Abb. 59: Veränderung der chemischen Verschiebung eines Protons in β -Stellung zur Oximfunktion in Abhängigkeit von deren *Z*- bzw. *E*-Konfiguration. In **88a** beträgt die chemische Verschiebung des fett dargestellten Protons 8,80 ppm; in **88b** nur 8,17 ppm (Vega und Díaz, 1997).

Die Argumentation wird weiter gestützt durch die Veränderungen, die eintreten, wenn man Natronlauge zur Meßprobe von Indirubin-3'-oxim zufügt. Natronlauge bewirkt eine Deprotonierung der Oximgruppe, und das Einbringen einer negativen Ladung bewirkt im allgemeinen, vor allem in delokalisierten Systemen, einen Hochfeldshift der Signale. Im vorliegenden Fall werden tatsächlich alle Signale der Kohlenstoffprotonen bis auf eines um etwa -0,3 ppm hochfeldverschoben (**Abb. 60**). Das Signal bei 8,24 ppm wird dagegen um etwa +0,25 ppm tieffeldverschoben. Die negative Ladung am

Oximsauerstoff führt zu einer Verstärkung der Wasserstoffbrückenbindung und somit zu einer weiteren Entschirmung des C4'-Protons.

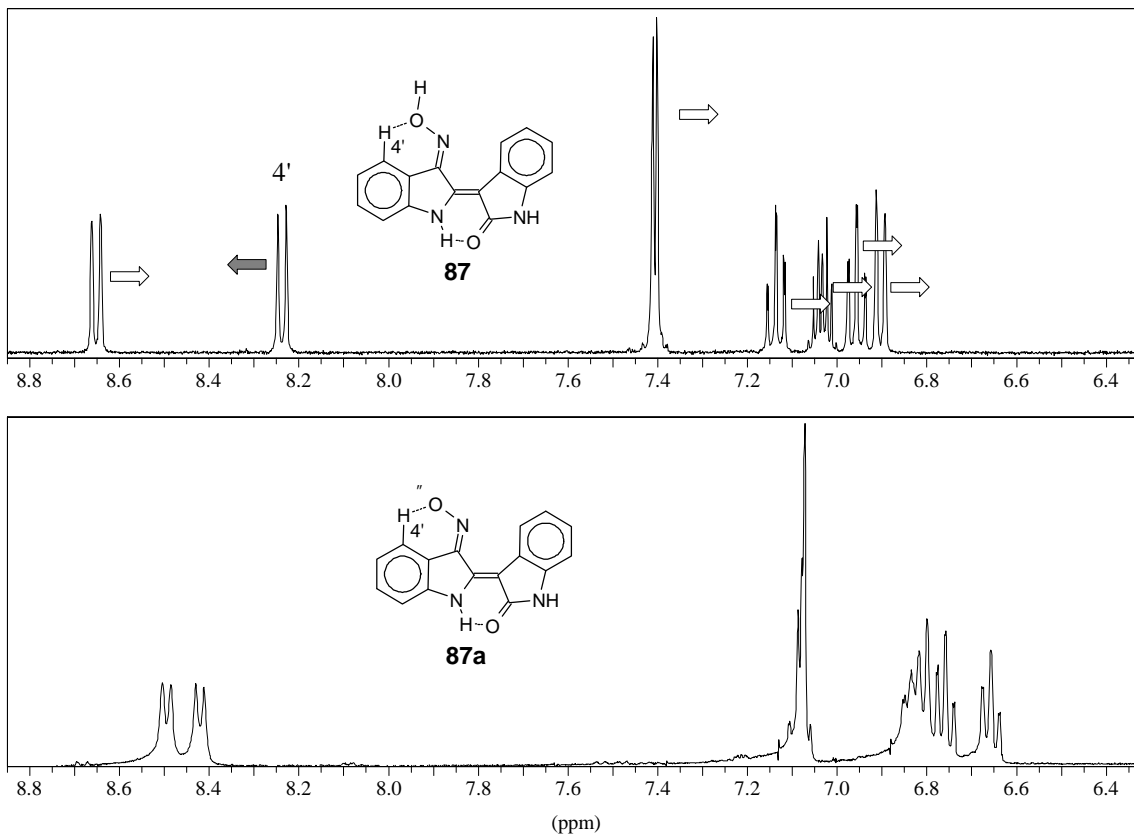


Abb. 60: ^1H -NMR-Spektrum von **87**, Bereich der aromatischen CH-Signale; oben: ohne NaOH, die Pfeile deuten die Verschiebungsrichtung der Signale bei Deprotonierung an; unten: mit NaOH (deprotoniert).

Analoge Beobachtungen wurden auch an 1-Nitroso-2-naphthol (**89**) gemacht (Vainiotalo und Vepsäläinen, 1986). 1-Nitroso-2-naphthol liegt in seiner tautomeren Oximform **89** vor. Das Proton an C8 erfährt durch die Nachbarschaft zum Oximsauerstoffatom bereits einen stark entschirmenden Effekt und tritt bei 8,90 ppm in Resonanz. Eine Deprotonierung der Oximgruppe (**Abb. 61**) bewirkt in diesem System bei allen Signalen nur eine geringe (meist Hochfeld-) Verschiebung, mit Ausnahme desjenigen von C8H, das stark tieffeldverschoben wird (+ 0,59 ppm).

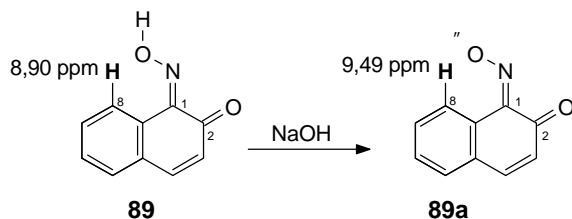


Abb. 61: Veränderung der chemischen Verschiebung des Protons an C8 in der tautomeren Form **89** von 1-Nitroso-2-naphthol bei Zusatz von Natronlauge. Die Deprotonierung des Oxims bewirkt einen entschirmenden Effekt auf das β -ständige Proton (Vainiotalo und Vepsäläinen, 1986).

Das Signal bei 13,48 ppm wird dem Oximproton zugeordnet, da ein Tieffeldshift von mehr als +2,5 ppm gegenüber unsubstituiertem Indirubin für eines der beiden aromatischen NH-Protonen unwahrscheinlich erscheint. Zusätzlich spricht für diese Zuordnung, daß im Spektrum von 5-Iodindirubin-3'-oxim das entsprechende Signal als einziges eine Verbreiterung zeigt, wie sie eher für Oximprotonen als für aromatische NH-Protonen zu erwarten ist. Das Proton an C4 ist ähnlich stark entschirmt wie in Indirubin, erfährt allerdings im Vergleich dazu einen leichten Hochfeldshift (-0,11 ppm). Dies zeigt, daß in 3'-Oximderivaten eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Oximstickstoff (N^3) und dem C4-Proton (**Abb. 58**) existiert, analog jener im unsubstituierten Indirubin zwischen dem Carbonylsauerstoffatom (O^3) und dem C4-Proton (Pandraud, 1961). Die Hochfeldverschiebung des Signals weist dabei allerdings auf eine Abschwächung der Wasserstoffbrückenbindung gegenüber Indirubin hin.

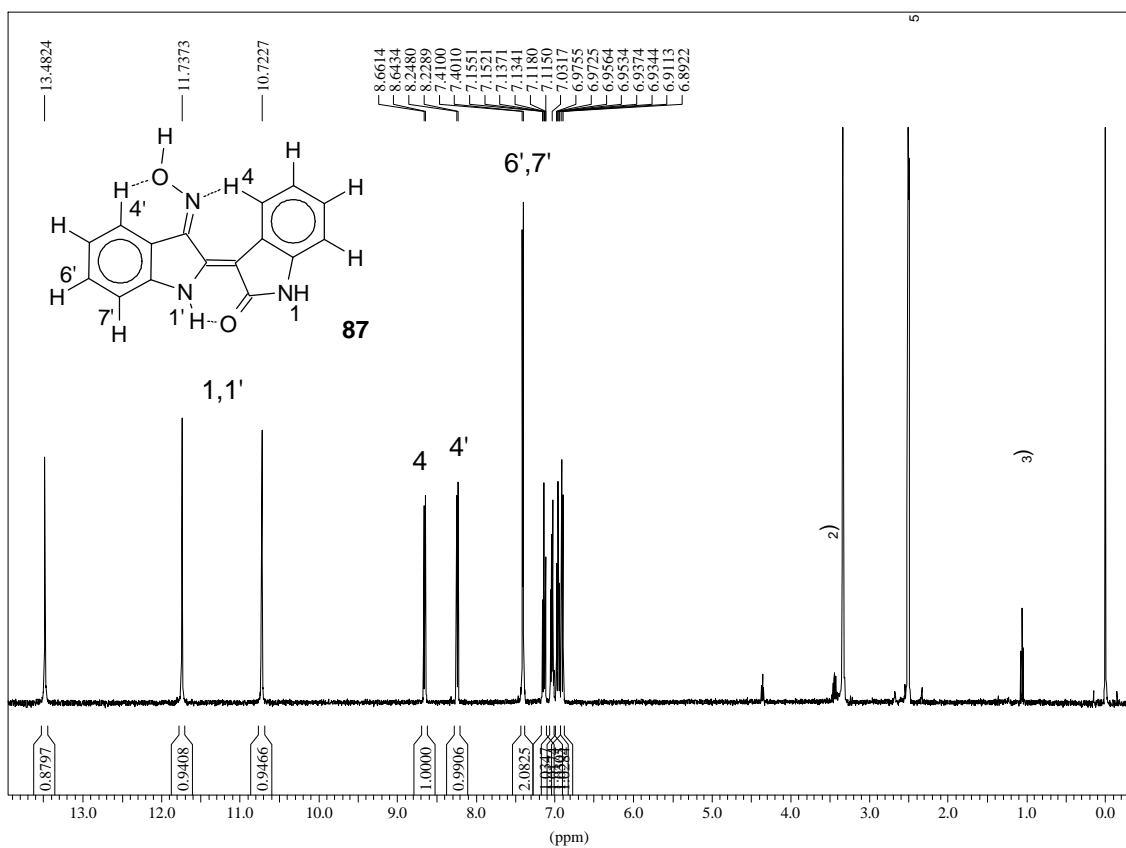


Abb. 62: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **87**.

Tab. 45: Signallage und Kopplungen im ^1H -NMR-Spektrum von **87**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|------------|
| 13,48 | s | NOH |
| 11,73 und 10,72 | s | N1H, N1'H |
| 8,65 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,2$ Hz | C4H |
| 8,24 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,6$ Hz | C4'H |
| 7,41 - 7,40 | m | C6'H, C7'H |
| 7,13 | pt | C6H |
| 7,06 - 7,01 | m | C5'H |
| 6,95 | pt | C5H |
| 6,90 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,6$ Hz | C7H |

Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigt starke Ähnlichkeit mit jenem vom unsubstituierten Indirubin. Die stärksten Veränderungen erfahren erwartungsgemäß die Kohlenstoffatome C3', C3 und C2'. Das Kohlenstoffatom C3' erfährt durch den Austausch des Carbonylsauerstoffatoms gegen den Hydroxyimino-substituenten einen Hochfeldshift von -37,05 ppm und tritt bei 151,22 ppm in Resonanz. Das Signal von C3 ist um -8,09 ppm und C2' um -7,03 ppm hochfeldverschoben. Außerdem erfährt C7a' einen Tieffeldshift von +6,35 ppm; alle weiteren Signale unterscheiden sich nur geringfügig von den entsprechenden im Spektrum von Indirubin.

Das Signal bei 127,95 ppm wird C4' zugeordnet und das Signal bei 125,92 ppm C4. Im Spektrum von 5-Iodindirubin-3'-oxim bleibt das Signal von C4' nahezu unverändert (+1,60 ppm) Dagegen erfährt erwartungsgemäß das Signal von C4 einen Tieffeldshift (+7,48 ppm). Durch diese Zuordnung wird die Reihenfolge der Signale C4 und C4' im Vergleich zu Indirubin vertauscht. Eine Erklärung dafür ist die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Oximsauerstoffatom und dem C4'-Proton sowie eventuell eine Abschwächung der Wasserstoffbrückenbindung vom Oximstickstoff zu C4H im Vergleich zur Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonylsauerstoff und C4H in Indirubin.

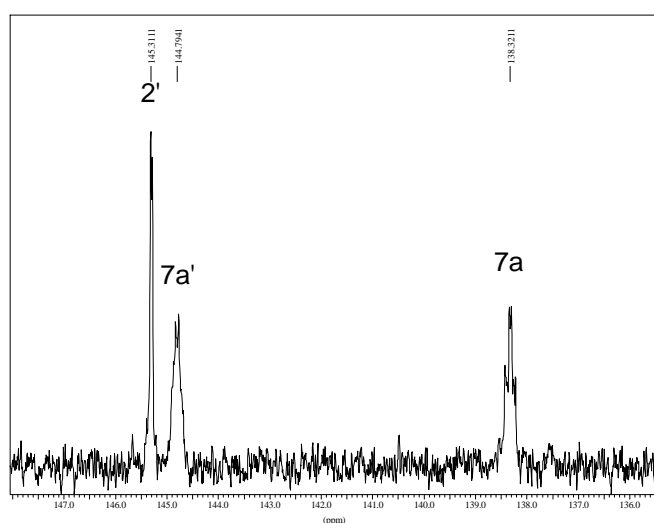


Abb. 63: ^{13}C -NMR-Spektrum von **87**. Unterscheidung der Signale von C2' und C7a'. Die Signale von C7a und C7a' zeigen jeweils mindestens eine *meta*-C,H-Kopplung. Das Signal von C2' ist erwartungsgemäß ein scharfes Singulett.

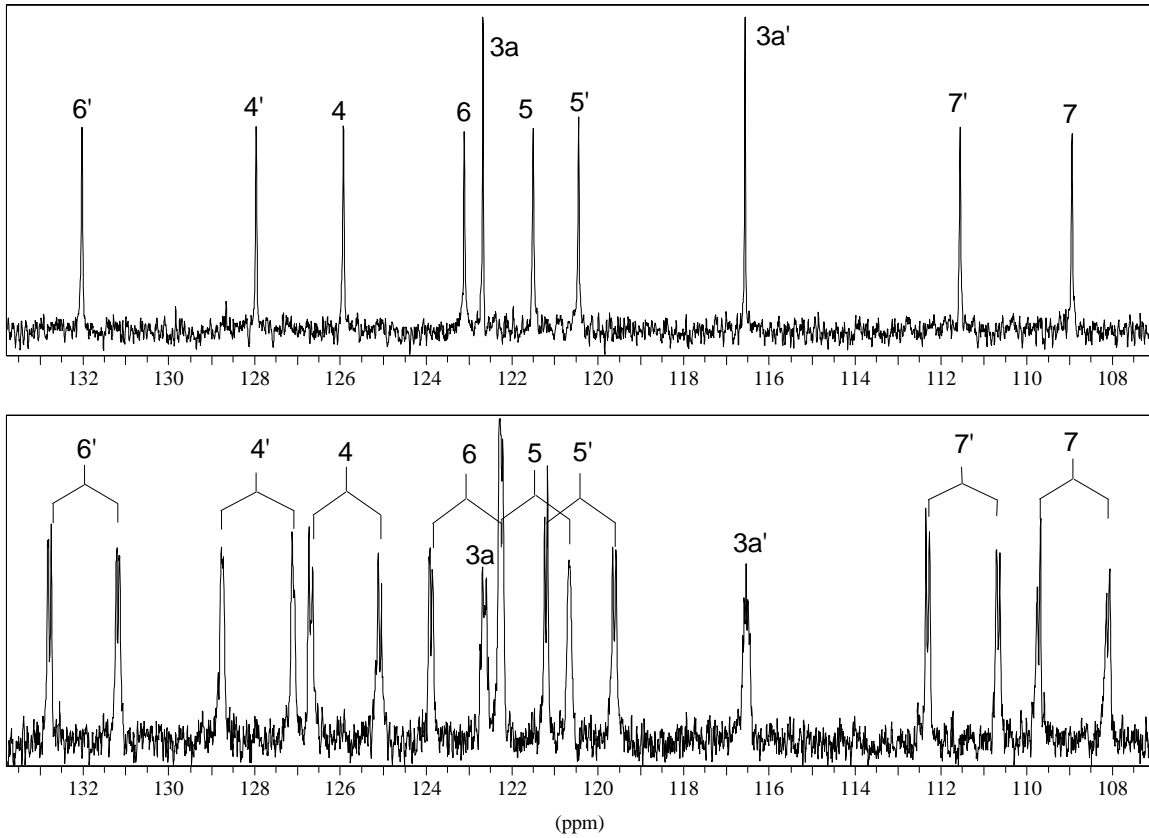
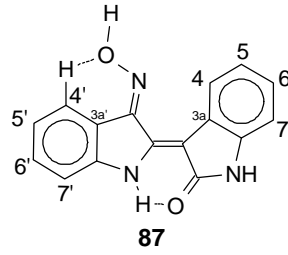
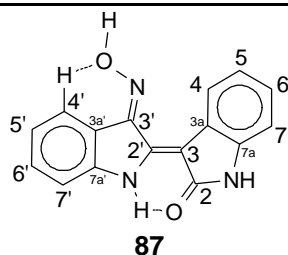
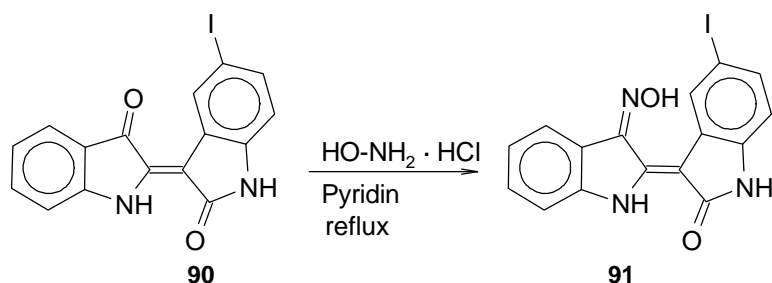


Abb. 64: ^{13}C -NMR-Spektrum von **87**, Bereich der wasserstofftragenden Kohlenstoffatome, oben: ^1H -breitband-entkoppelt, unten protonengekoppelt.

Tab. 46: Signallage und Kopplungen im ^{13}C -NMR-Spektrum von **87**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-------------------------|--|-----------------|
| 170,95 | s | C2 |
| 151,22 | s | C3' |
| 145,32 | s | C2' |
| 144,83 | s | C7a' |
| 138,34 | s | C7a |
| 132,02 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 159,5$ Hz | C6' |
| 127,95 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 164,4$ Hz | C4' |
| 125,92 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 154,0$ Hz | C4 |
| 123,09 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 165,1$ Hz | C6 |
| 122,66 | s | C3a |
| 121,49 und 120,43 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 164,6$ Hz d, $^1J_{\text{C,H}} = 160,2$ Hz | C5 und C5 |
| 116,54 | s | C3a' |
| 111,52 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 165,8$ Hz | C7' |
| 108,91 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 162,3$ Hz | C7 |
| 98,88 | s | C3 |

4.1.25 5-Iodindirubin-3'-oxim (**91**)



5-Iodindirubin wird mit Hydroxylaminhydrochlorid in Pyridin zum Sieden erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wird 5-Iodindirubin-3'-oxim aus 1 n Salzsäure ausgefällt und aus Ethanol umkristallisiert. Es fällt dabei in guter Ausbeute in Form roter Kristalle an. Die Synthese wird in Anlehnung an eine Patentschrift (Farbwerke vorm. Meister Lucius & Brüning, 1913) durchgeführt.

^1H -NMR-Spektrum: Das verbreiterte Erscheinungsbild des Signals bei 13,68 ppm spricht für die getroffene Zuordnung zum Oximproton (siehe auch Kapitel 4.1.26).

Die Signale des gestrichenen Systems erfahren im Vergleich zu Indirubin-3'-oxim (siehe Kapitel 4.1.24) keine Änderungen. Die *ortho*-Positionen zum Iodsubstituenten erfahren die zu erwartenden

Tieffeldverschiebungen (C4H: +0,25 ppm, C6H: +0,28 ppm) und das C7-Proton wird erwartungsgemäß hochfeldverschoben (-0,17 ppm). Das Signal des C5-Prottons bei 6,95 ppm ist verschwunden.

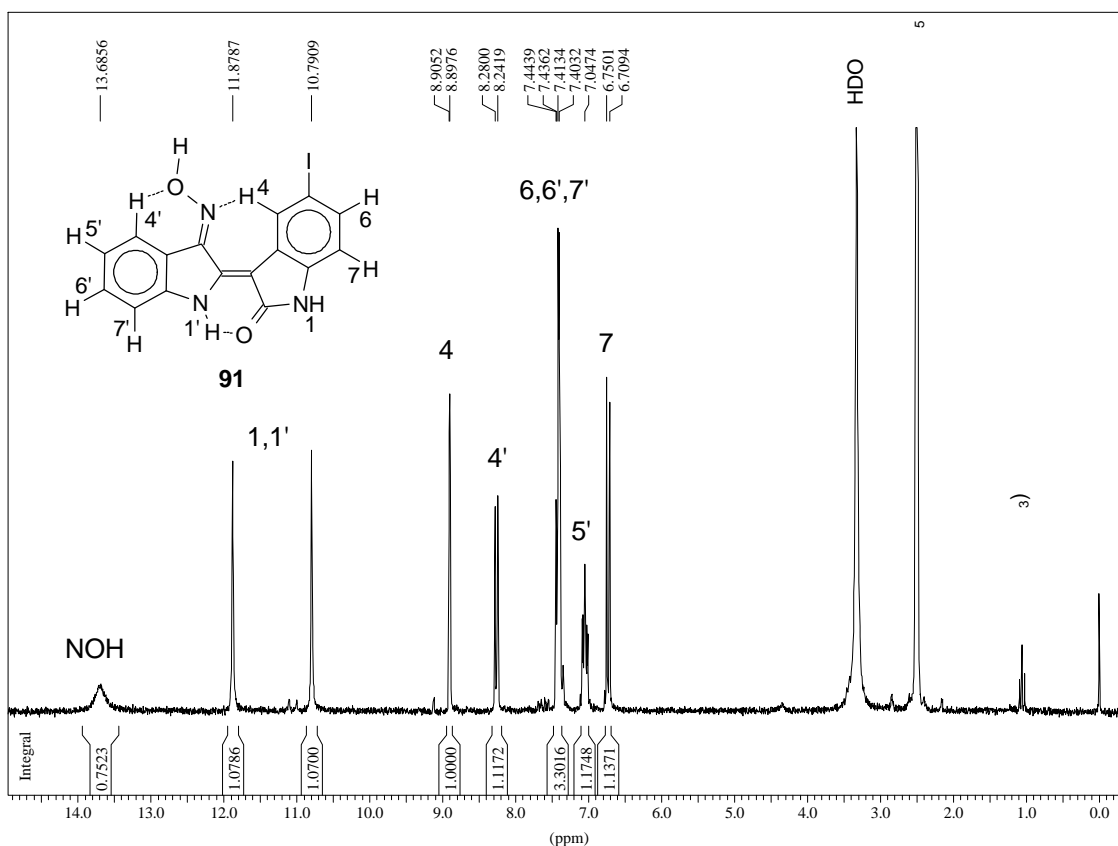


Abb. 65: ^1H -NMR-Spektrum von **91**.

Tab. 47: Signallage und Kopplungen im ^1H -NMR-Spektrum von **91**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|----------------|
| 13,68 | s | NOH |
| 11,88 und 10,79 | 2 s | N1H, N1'H |
| 8,90 | s | C4H |
| 8,26 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,6$ Hz | C4'H |
| 7,44 - 7,40 | m | C6, C6'H, C7'H |
| 7,09 - 7,01 | m | C5'H |
| 6,73 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 6,7$ Hz | C7H |

Im ^{13}C -NMR-Spektrum erfahren nur die Signale des nichtgestrichenen Systems bemerkenswerte Änderungen im Vergleich zu Indirubin-3'-oxim. Das Signal von C5 wird um -37 ppm hochfeldverschoben; dies ist auf die starke Abschirmung zurückzuführen, die ein Iodatome aufgrund seiner großen Elektronenhülle auf das direkt gebundene Kohlenstoffatom ausübt. Die *ortho*-Positionen werden im zu erwartenden Rahmen beeinflusst (C4: +7,48 ppm, C6: +6,91 ppm), ebenso die *meta*-Positionen (C3a: +2,74 ppm, C7: +1,98 ppm) und die *para*-Position (C7a: -1,14 ppm).

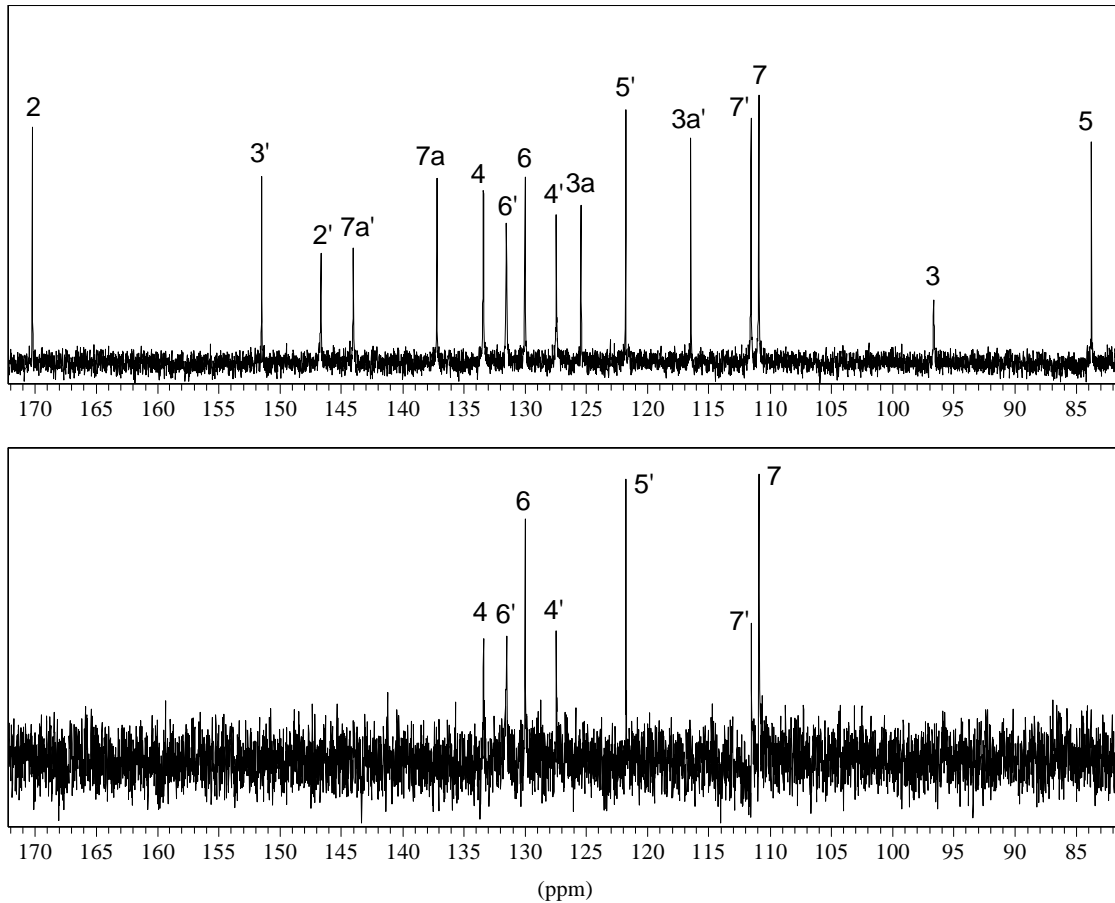
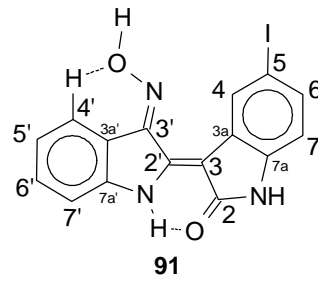
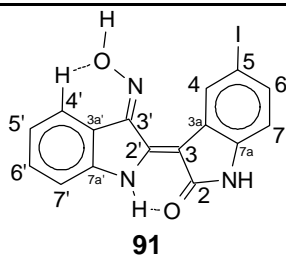


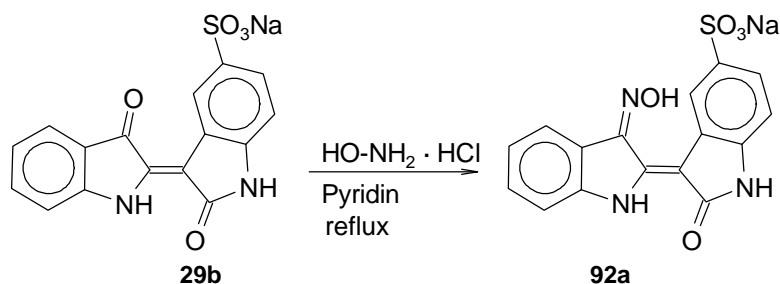
Abb. 66: ^{13}C -NMR-Spektrum von **91**, oben protonenbreitbandentkoppelt, unten DEPT-Messung. Diese liefert Informationen darüber, ob an einem Kohlenstoffatom Protonen sitzen und unter Umständen wie viele; C,H-Kopplungen werden nicht sichtbar. Signale, die bei 5-Iodindirubin-3'-oxim (**91**) auch im DEPT-Spektrum sichtbar sind, tragen ein Proton und werden in **Tab. 48** mit d bezeichnet.

Tab. 48: Signallage im ^{13}C -NMR-Spektrum von **91**

| δ in ppm | Signalform ¹⁾ | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------|-----------|
| 170,25 | s | C2 |
| 151,52 | s | C3' |
| 146,68 | s | C2' |
| 144,01 | s | C7a' |
| 137,20 | s | C7a |
| 133,40 | d | C4 |
| 131,52 | d | C6' |
| 130,00 | d | C6 |
| 127,42 | d | C4' |
| 125,40 | s | C3a |
| 121,77 | d | C5' |
| 116,44 | s | C3a' |
| 111,51 | d | C7' |
| 110,89 | d | C7 |
| 96,59 | s | C3 |
| 83,69 | s | C5 |

¹⁾Neben der Aufnahme eines protonenbreitbandenkoppelten Spektrums wurde eine Aufnahme mit dem DEPT-Verfahren durchgeführt.

4.1.26 3'-Hydroxyiminoindirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (92a)



Natriumindirubin-5-sulfonat wird mit Hydroxylaminhydrochlorid in Pyridin zum Sieden erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird nach dem Abkühlen in 1 n Salzsäure gegossen und das Oxim durch Aussalzen mit Kochsalzlösung isoliert. Aus Wasser umkristallisiert entstehen schwarze, rötlich schimmernde, spröde Schuppen. Von Wasserspuren befreit erhält man das Natriumsalz der 3'-Hydroxyiminoindirubin-5-sulfonsäure in mäßiger Ausbeute als schwarzes, hygroskopisches Pulver.

Im ^1H -NMR-Spektrum ändern sich im Vergleich zu Indirubin-3'-oxim im Wesentlichen nur die drei CH-Signale des nichtgestrichenen Systems. C4H erfährt einen Tieffeldshift von +0,27 ppm und C6H

einen Tieffeldshift von +0,34 ppm. Das Signal bei 6,82 ppm stammt vom C7-Proton. Es erfährt einen für eine *meta*-Sulfonsäuresubstitution ungewöhnlichen Hochfeldshift von -0,08 ppm, wie es schon im Natriumsalz der Indirubin-5-sulfonsäure im Vergleich zum unsubstituierten Indirubin beobachtet wurde.

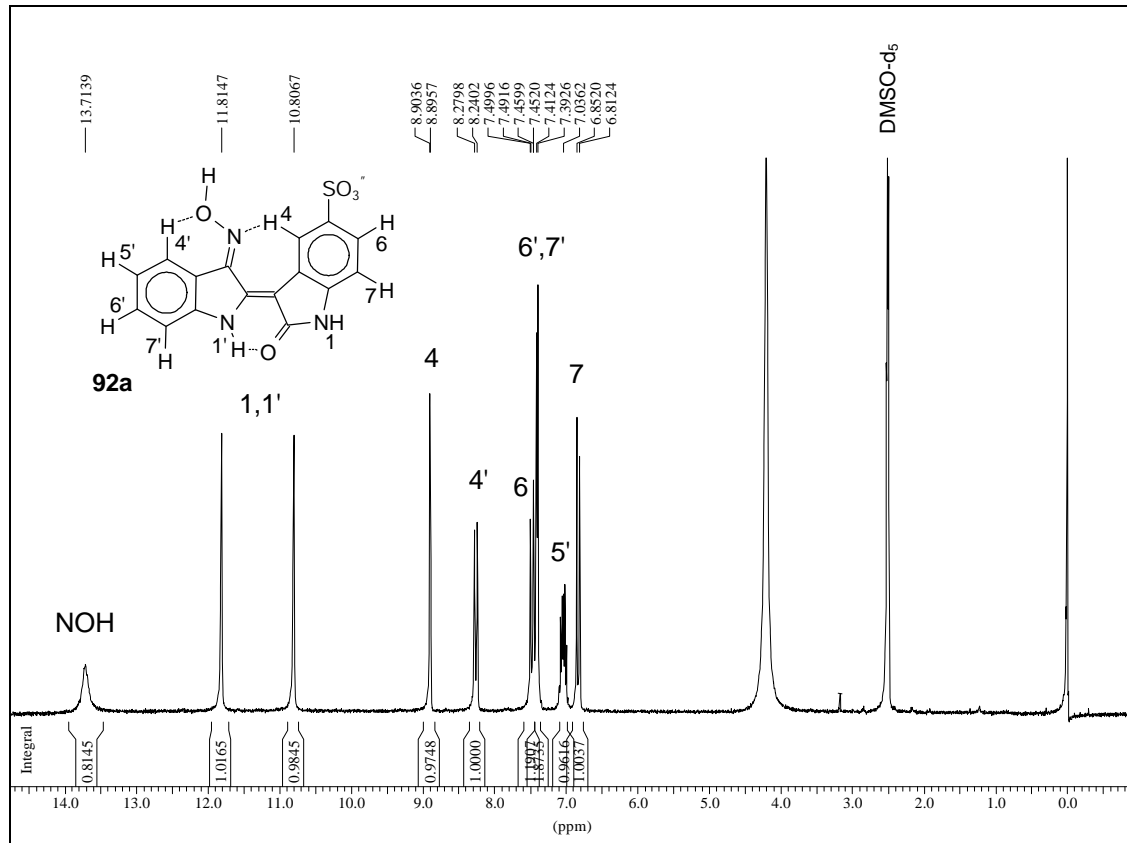


Abb. 67: ^1H -NMR-Spektrum von 92a.

Tab. 49: Signallage und Kopplungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **92a**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|-----------|
| 13,79 | s | NOH |
| 11,80 und 10,82 | s | N1H, N1'H |
| 8,92 | s | C4H |
| 8,26 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,7$ Hz | C4'H |
| 7,48 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,9$ Hz | C6H |
| 7,41 - 7,39 | m | C6', C7' |
| 7,10 - 6,97 | m | C5'H |
| 6,82 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,1$ Hz | C7H |

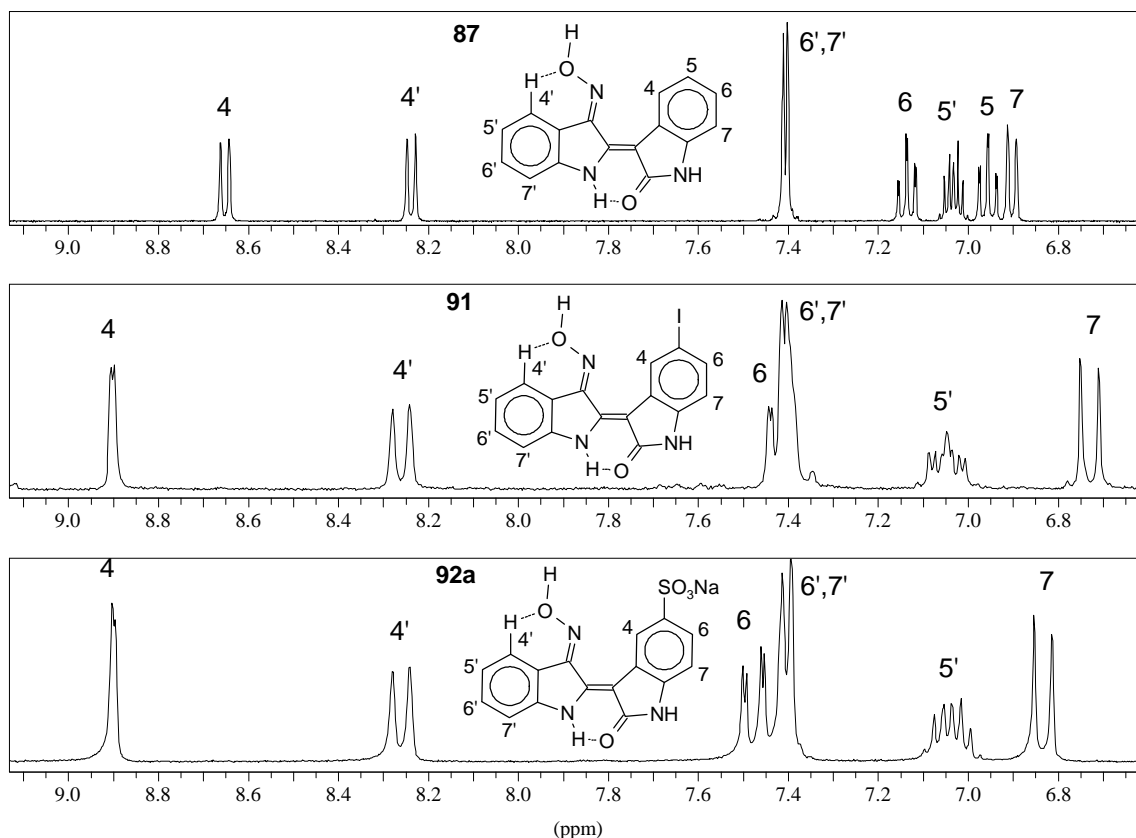
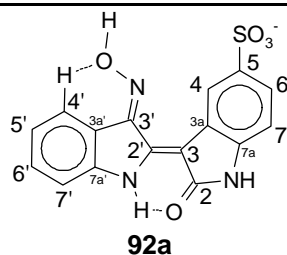


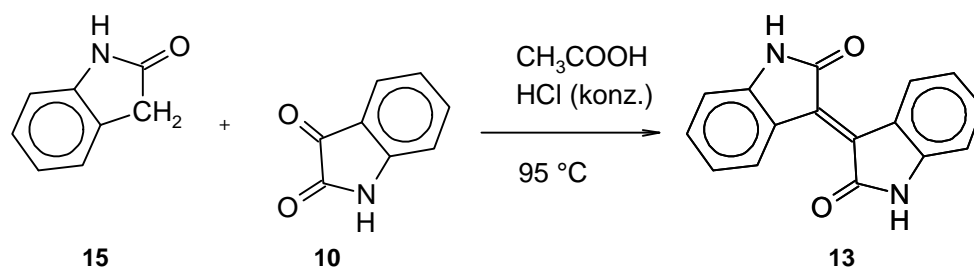
Abb. 68: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Oximderivate; **87** (oben), **91** (mitte), **92a** (unten). Veränderung der Signale von oben nach unten: das Signal von C4H wird tieffeldverschoben, gleichzeitig verschwindet die $^3J_{\text{H,H}}$ -Kopplung. Das Signal von C6H wird tieffeldverschoben, gleichzeitig wird aus dem zum Pseudotriplett verschmolzenen Doppel-doublet ein Dublett, bei dem zusätzlich noch die $^4J_{\text{H,H}}$ -Kopplung zu C4H erkennbar wird (unten). Das obere Spektrum wurde bei 400 MHz aufgenommen, das mittlere und das untere bei 200 MHz; deshalb erscheinen die Kopplungen auf der ppm-Skala oben kleiner.

Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum verändern sich im Vergleich zu Indirubin-3'-oxim in nennenswertem Umfang nur Signale des nichtgestrichenen Systems. C5 erfährt einen für eine Sulfonsäuresubstitution typischen Tieffeldshift von +17,00 ppm. Die Signale der *ortho*- und *meta*-Positionen werden erwartungsgemäß jeweils um -1 bis -2 ppm leicht hochfeldverschoben und die *para*-Position erfährt einen leichten Tieffeldshift (C7a: +2,53 ppm), wie er typisch ist für eine Sulfonsäuresubstitution.

Tab. 50: Signallage und Kopplungen im ^{13}C -NMR-Spektrum von **92a**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|----------------------------------|-----------|
| 171,17 | s | C2 |
| 151,32 | s | C3' |
| 145,52 | s | C2' |
| 144,53 | s | C7a' |
| 140,87 | s | C7a |
| 138,21 | s | C5 |
| 131,84 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 158,8$ Hz | C6' |
| 128,02 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 167,8$ Hz | C4' |
| 123,74 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 163,0$ Hz | C4 |
| 121,65 | s | C3a |
| 121,42 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 159,5$ Hz | C6 |
| 120,55 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 167,2$ Hz | C5' |
| 116,59 | s | C3a' |
| 111,36 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 165,8$ Hz | C7' |
| 107,32 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 162,3$ Hz | C7 |
| 98,64 | s | C3 |

4.2 Synthese von Isoindigo (13)



Die Synthese wird nach einer Vorschrift von Wahl und Bagard (1909 a und b) durchgeführt. Oxindol und Isatin werden in Essigsäure, der Salzsäure zugesetzt wurde, kondensiert. Isoindigo liegt nach dem Waschen und Trocknen in sehr guter Ausbeute als braunes Pulver vor, das nicht weiter aufgereinigt werden muß.

Im ^1H -NMR-Spektrum findet man im Prinzip die Signale des ungestrichenen Teils von Indirubin wieder. Die Protonen an C4 bzw. C4' sind im Vergleich dazu um +0,31 ppm tieffeldverschoben; der Effekt der Wasserstoffbrückenbindung zwischen diesen Wasserstoffatomen und den entsprechenden Sauerstoffatomen an C2' bzw. C2 ist hier also noch ausgeprägter als bei Indirubin.

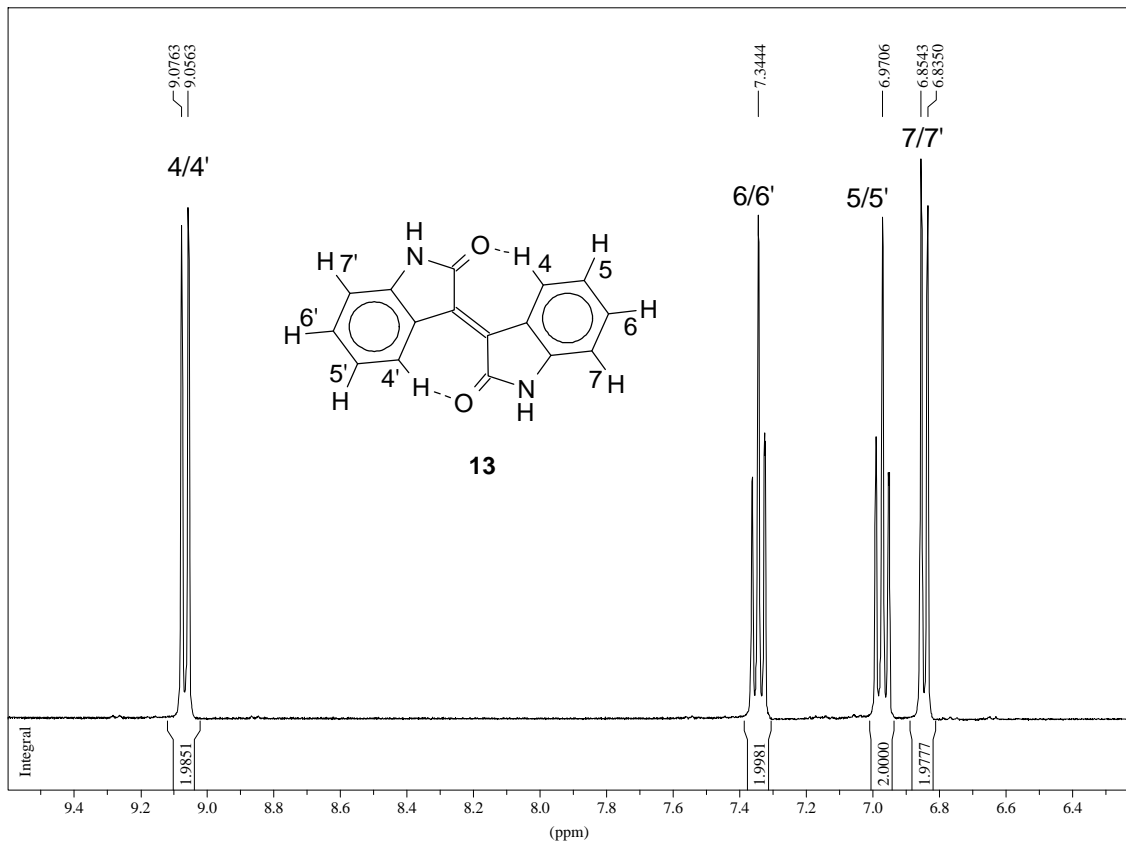


Abb. 69: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **13**; aromatischer Bereich.

Tab. 51: Signallage und Kopplungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **13**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|------------|
| 10,90 | s | N1H, N1'H |
| 9,07 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,0$ Hz | C4H, C4'H |
| 7,34 | pt | C6H, C6'H |
| 6,97 | pt | C5'H, C5'H |
| 6,85 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,7$ Hz | C7H, C7'H |

Auch im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum entsprechen die Signale im Prinzip jenen des ungestrichenen Systems von Indirubin. Ausnahme sind C3 und C3', deren Signal gegenüber jenem von C3 in Indirubin einen Tieffeldshift von +26,27 ppm aufweist. Dies ist in erster Linie darauf zurückzuführen, daß sich in Isoindigo in β -Stellung zu C3/C3' kein Stickstoffatom mehr befindet.

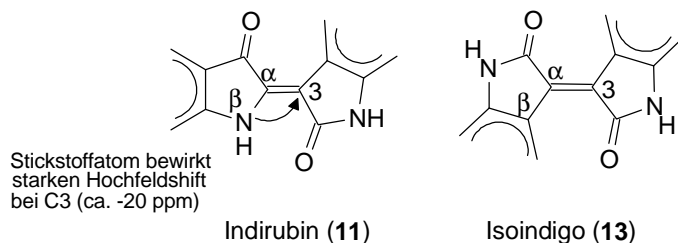
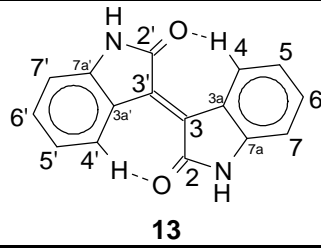


Abb. 70: In Indirubin (**11**) ist β -ständig zu C3 ein Stickstoffatom vorhanden, das zu einem starken Tieffeldshift für C3 führt. In Isoindigo (**13**) ist in der analogen Position kein Stickstoffatom.

Tab. 52: Signallage und Kopplungen im ^{13}C -NMR-Spektrum von **13**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|----------------------------------|-----------|
| 168,88 | s | C2, C2' |
| 143,98 | s | C7a, C7a' |
| 133,24 | s | C3, C3' |
| 132,52 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 159,9$ Hz | C4, C4' |
| 129,21 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 166,5$ Hz | C6, C6' |
| 121,58 | s | C3a, C3a' |
| 121,04 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 161,2$ Hz | C5, C5' |
| 109,42 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 162,5$ Hz | C7, C7' |

4.3 Zusammenstellung der NMR-Daten der Indirubin-derivate und des Isoindigos

In **Tab. 54** und **Tab. 55** sind die NMR-Ergebnisse zu den Indirubinderivaten und Isoindigo zusammengestellt. In **Tab. 53** sind die Substanznummern erklärt. Die Verbindungen sind in Gruppen nach Substituenten geordnet zusammengestellt.

Tab. 53: Erläuterung der Substanznummern zu **Tab. 54** und **Tab. 55**

| | | |
|--|-----|--|
| | 11 | Indirubin |
| 1-sub. Indirubin- der. | 25 | 1-Methylindirubin |
| | 28 | 1-Phenylindirubin |
| weitere 5-substituierte Indirubinderivate | 90 | 5-Iodindirubin |
| | 31 | 5-Bromindirubin |
| | 33 | 5-Chlorindirubin |
| | 62 | 5-Fluorindirubin |
| | 36 | 5-Methylindirubin |
| | 65 | 5-Nitroindirubin |
| | 67 | 5'-Bromindirubin |
| | 68 | 5,5'-Dibromindirubin |
| Indirubin- 5-sulfonsäurederivate | 29b | Natriumsalz der Indirubin-5-sulfonsäure |
| | 69 | Natriumsalz der 5'-Bromindirubin-5-sulfonsäure |
| | 72 | Indirubin-5-sulfonamid |
| | 75 | Indirubin-5-sulfonsäuremethanilamid |
| | 78 | Indirubin-5-sulfonsäuredimethanilamid |
| | 82 | Indirubin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid |
| | 86 | Indirubin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid |
| Indirubin- 3'-oximderi- vate | 87 | Indirubin-3'-oxim |
| | 91 | 5-Iodindirubin-3'-oxim |
| | 92a | Natriumsalz der 3'-Hydroxyiminoindirubin-5-sulfonsäure |
| | 13 | Isoindigo |

Tab. 54: Zusammenstellung der ¹H-NMR-Daten der Indirubinderivate und des Isoindigos (**13**), Erläuterung der Substanznummern siehe **Tab. 53**

| | C4H | C5H | C6H | C7H | C4'H | C5'H | C6'H | C7'H | NH_{arom} | CH₃ | N-CH₂ | O-CH₂ |
|-------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--|---------------------------|--------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| 11 ¹⁾ | 8,76 | 7,04 - 7,00 | 7,25 | 6,92 | 7,65 | 7,04 - 7,00 | 7,56 | 7,39 | 10,86; 10,65 | - | - | - |
| 25 | 8,81 | 7,12 - 7,02 | 7,35 | 7,12 - 7,02 | 7,67 | 7,12 - 7,02 | 7,59 | 7,43 | 11,07 | 3,29 | - | - |
| 28 ²⁾ | 8,92 | 7,16 | 7,29 | 6,83 | 7,69 | 7,05 | 7,64 - 7,58 oder 7,53 - 7,48 ²⁾ | 7,42 | 11,17 | - | - | - |
| 90 ¹⁾ | 9,11 | - | 7,52 - 7,59 | 6,75 | 7,65 | 7,04 | 7,52 - 7,59 | 7,42 | 11,09; 11,00 | - | - | - |
| 31 | 8,94 | - | 7,41- 7,37 | 6,86 | 7,66 | 7,05 | 7,59 | 7,41- 7,37 | 11,10; 11,00 | - | - | - |
| 33 | 8,78 | - | 7,27 | 6,89 | 7,65 | 7,04 | 7,58 | 7,42 | 11,09; 10,99 | - | - | - |
| 62 | 8,56 | - | 7,10 - 7,01 | 6,87 | 7,65 | 7,10 - 7,01 | 7,58 | 7,42 | 11,00 ³⁾ | - | - | - |
| 36 | 8,63 | - | 7,08 - 7,00 | 6,79 | 7,64 | 7,08 - 7,00 | 7,58 | 7,42 | 11,00; 10,79 | 2,33 | - | - |
| 65 | 9,60 | - | 8,13 | 7,01 | 7,64 | 7,05 | 7,58 | 7,40 | 11,49; 11,15 | - | - | - |
| 67 | 8,73 | 7,02 | 7,26 | 6,89 | 7,76 | - | 7,71 | 7,39 | 11,08; 10,89 | - | - | - |
| 68 | 8,88 | - | 7,42 - 7,36 | 6,84 | 7,76 | - | 7,71 | 7,42 - 7,36 | 11,16; 11,01 | - | - | - |
| 29b | 9,13 | - | 7,61 - 7,54 | 6,84 | 7,67 | 7,04 | 7,61 - 7,54 | 7,43 | 11,05; 10,99 | - | - | - |
| 69 | 9,09 | - | 7,55 | 6,82 | 7,79 | - | 7,73 | 7,40 | 11,11 ³⁾ | - | - | - |
| 72 | 9,31 | - | 7,69 | 7,08 - 7,04 | 7,74 | 7,08 - 7,04 | 7,60 | 7,44 | 11,25; 11,15 | - | - | - |
| 75 | 9,27 | - | 7,71 - 7,67 | 7,09 - 7,05 | 7,71 - 7,67 | 7,09 - 7,05 | 7,61 | 7,45 | 11,30; 11,18 | 2,46 | - | - |
| 78 | 9,21 | - | 7,72 - 7,57 | 7,13 - 7,02 | 7,72 - 7,57 | 7,13 - 7,02 | 7,72 - 7,57 | 7,44 | 11,33; 11,18 | 2,65 | - | - |
| 82 | 9,27 | - | 7,71 - 7,69 | 7,07 | 7,71 - 7,69 | 7,07 | 7,61 | 7,46 - 7,43 ⁴⁾ | 11,29; 11,18 | - | 2,84 | 3,40 |
| 86 | 9,26 | - | 7,72 - 7,68 | 7,09 - 7,05 | 7,72 - 7,68 | 7,09 - 7,05 | 7,61 | 7,45 | 11,32; 11,18 | - | 3,20 | 3,56 |
| 87 | 8,65 | 6,95 | 7,13 | 6,90 | 8,24 | 7,06 - 7,01 | 7,41 - 7,40 | 7,41 - 7,40 | 11,73; 10,72 | - | - | - |
| 91 | 8,90 | - | 7,44 - 7,40 | 6,73 | 8,26 | 7,09 - 7,01 | 7,44 - 7,40 | 7,44 - 7,40 | 11,88; 10,79 | - | - | - |
| 92a | 8,92 | - | 7,48 | 6,82 | 8,26 | 7,10 - 6,97 | 7,41 - 7,39 | 7,41 - 7,39 | 11,80; 10,82 | - | - | - |
| 13 | 9,07 | 6,97 | 7,34 | 6,85 | 9,07 | 6,97 | 7,34 | 6,85 | 10,90 | - | - | - |

¹⁾Hössel, 1995, ²⁾ C6'H und die Signale des Phenylrings (7,64 – 7,58 und 7,53 – 7,48ppm) überlagern; ³⁾ 2H, verbreitert; ⁴⁾ C7'H und das Signal des Sulfonamidprotons überlagern.

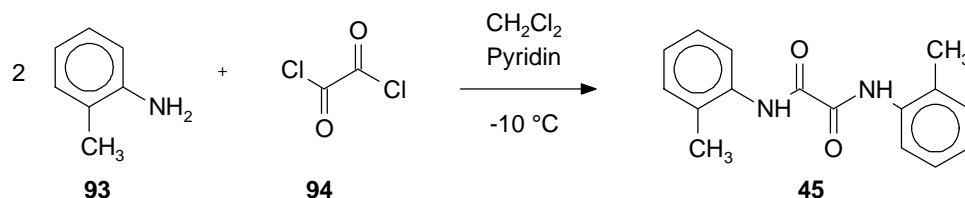
Tab. 55: Zusammenstellung der ¹³C-NMR-Daten der Indirubin-derivate und des Isoindigos (**13**), Erläuterung der Substanznummern siehe Tab. 53

| | C2 | C3 | C3a | C4 | C5 | C6 | C7 | C7a | C2' | C3' | C3a' | C4' | C5' | C6' | C7' | C7a' | CH ₃ | NCH ₂ | OCH ₂ |
|-------------------------|--------|--------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------|--------------------------|--------|--------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------|--------|--------------------------|-----------------|------------------|------------------|
| 11 ¹⁾ | 171,11 | 106,97 | 121,58 | 129,15 | 121,21 oder 121,19 | 124,62 oder 124,20 | 109,57 | 141,07 | 152,35 | 188,27 | 119,37 | 124,62 oder 124,20 | 121,21 oder 121,19 | 136,85 | 113,15 | 138,48 | - | - | - |
| 28 ²⁾ | 168,36 | 104,96 | 120,80 | 128,99 oder 127,93 | 122,34 oder 121,50 | 124,56 oder 124,44 | 108,71 | 141,34 | 152,32 | 188,44 | 118,96 | 124,56 oder 124,44 | 122,34 oder 121,50 | 137,18 | 113,48 | 139,11 oder 133,97 | - | - | - |
| 90 ¹⁾ | 170,48 | 105,18 | 124,03 | 137,00 | 83,73 | 132,49 | 111,85 | 140,44 | 152,41 | 188,54 | 119,27 | 124,44 | 121,65 | 137,15 | 113,43 | 139,26 | - | - | - |
| 31 | 170,50 | 104,92 | 123,41 | 131,03 | 112,89 | 126,60 | 111,24 | 139,74 | 152,42 | 188,77 | 118,92 | 124,49 | 121,64 | 137,29 | 113,53 | 139,16 | - | - | - |
| 33 | 170,52 | 104,95 | 122,85 | 128,16 | 125,00 | 124,41 oder 123,76 | 110,61 | 139,31 oder 139,10 | 152,39 | 188,72 | 118,85 | 124,41 oder 123,76 | 121,54 | 137,21 | 113,50 | 139,31 oder 139,10 | - | - | - |
| 62 | 171,02 | 105,93 | 122,41 | 115,24 | 157,40 | 111,34 | 110,13 | 137,31 | 152,60 | 188,96 | 118,98 | 124,56 | 121,64 | 137,36 | 113,57 | 139,12 | - | - | - |
| 36 | 171,93 | 106,79 | 121,45 | 129,72 | 129,72 | 125,11 | 109,17 | 138,65 oder 138,08 | 152,38 | 188,49 | 119,94 | 124,19 | 121,09 | 136,96 | 113,33 | 138,65 oder 138,08 | 20,99 | - | - |
| 65 | 170,93 | 103,51 | 121,59 | 124,69 oder 124,60 | 141,63 | 119,48 | 109,27 | 145,71 | 152,38 | 188,78 | 118,83 | 124,69 oder 124,60 | 121,97 | 137,37 | 113,68 | 139,97 | - | - | - |
| 67 | 170,64 | 107,43 | 121,20 oder 120,64 | 129,56 | 121,20 | 124,69 | 109,54 | 141,05 | 151,23 | 187,15 | 121,20 oder 120,64 | 126,31 | 112,63 | 138,87 | 115,49 | 137,69 | - | - | - |
| 29b | 171,14 | 106,25 | 120,50 | 126,83 | 138,45 | 122,57 | 108,20 | 141,64 oder 140,89 | 152,39 | 188,33 | 118,98 | 124,27 | 121,28 | 137,02 | 113,39 | 141,64 oder 140,89 | - | - | - |
| 72 | 170,98 | 104,92 | 121,13 | 126,98 | 137,24 | 122,27 | 109,22 | 142,99 | 152,45 | 188,52 | 119,01 | 124,44 | 121,72 | 137,24 | 113,56 | 139,32 | - | - | - |
| 75 | 170,85 | 104,48 | 121,42 | 127,61 | 131,93 | 123,13 | 109,41 | 143,36 | 152,45 | 188,68 | 118,90 | 124,50 | 121,73 | 137,28 | 113,58 | 139,43 | 28,65 | - | - |
| 78 | 170,51 | 104,16 | 121,48 | 128,06 | 127,64 | 123,18 | 109,11 | 143,53 | 152,10 | 188,37 | 118,71 | 124,22 | 121,36 | 136,93 | 113,22 | 139,34 | 37,20 | - | - |
| 82 | 170,87 | 104,52 | 121,36 | 127,53 | 133,20 | 122,95 | 109,44 | 143,32 | 152,46 | 188,70 | 118,92 | 124,52 | 121,74 | 137,29 | 113,60 | 139,44 | - | 45,00 | 59,85 |
| 86 | 170,81 | 104,31 | 121,69 | 127,98 | 131,51 | 122,88 | 109,48 | 143,59 | 152,48 | 188,87 | 118,91 | 124,64 | 121,79 | 137,32 | 113,62 | 139,61 | - | 51,32 | 60,01 |
| 87 | 170,95 | 98,88 | 122,66 | 125,92 | 121,49 oder 120,43 | 123,09 | 108,91 | 138,34 | 145,32 | 151,22 | 116,54 | 127,95 | 121,49 oder 120,43 | 132,02 | 111,52 | 144,83 | - | - | - |
| 91 | 170,25 | 96,59 | 125,40 | 133,40 | 83,69 | 130,00 | 110,89 | 137,20 | 146,68 | 151,52 | 116,44 | 127,42 | 121,77 | 131,52 | 111,51 | 144,01 | - | - | - |
| 92a | 171,17 | 98,64 | 121,65 | 123,74 | 138,21 | 121,42 | 107,32 | 140,87 | 145,52 | 151,32 | 116,59 | 128,02 | 120,55 | 131,84 | 111,36 | 144,53 | - | - | - |
| 13 | 168,88 | 133,24 | 121,58 | 132,52 | 121,04 | 129,21 | 109,42 | 143,98 | 168,88 | 133,24 | 121,58 | 132,52 | 121,04 | 129,21 | 109,42 | 143,98 | | | |

¹⁾ Hössel, 1995; ²⁾ Signale der Phenylkohlenstoffatome: C2" und C6": 129,46 ppm; C3" und C5": 126,75 ppm; nicht eindeutig zuordenbar: C1": 139,11 oder 133,97 ppm; C4": 128,99 oder 127,93 ppm

4.4 Weitere Synthesen

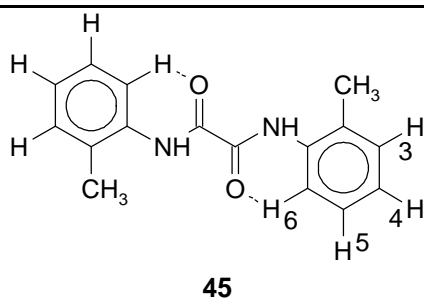
4.4.1 *N,N'*-Di-*o*-tolylloxamid (45)



Unter Schutzgas wird zu einer Lösung von *o*-Toluidin (**93**) und Pyridin in Dichlormethan eine Lösung von Oxalylchlorid (**94**) in Dichlormethan zugetropft. Nach Beendigung der Reaktion wird das Pyridin und nicht umgesetztes *o*-Toluidin mit 0,1 n Salzsäure ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, das Lösungsmittel abdestilliert und der verbleibende Rückstand aus Chloroform umkristallisiert. *N,N'*-Di-*o*-tolylloxamid kristallisiert in farblosen Kristallnadeln und wird in guten Ausbeuten erhalten.

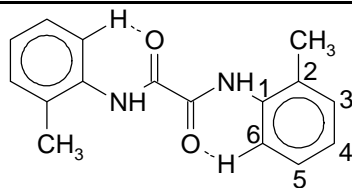
Im $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ erkennt man, ähnlich wie in den Spektren der Indirubinderivate, eines der CH-Signale (8,08 ppm) deutlich abgesetzt von den restlichen. Die Verschiebung in Richtung tiefes Feld kann wiederum mit der Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung erklärt werden. Die dadurch bewirkte zusätzliche Entschirmung führt für C6H zu dem beobachteten Tieffeldshift.

Tab. 56: Signallage und Kopplungen im $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ von **45**



| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|---------------------|
| 9,38 | s | 2 x NH |
| 8,08 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,1$ Hz | 2 x C6H |
| 7,30 - 7,23 | m | 2 x C3H, 2 x C5H |
| 7,14 | pt | 2 x C4H |
| 2,38 | s | 2 x CH ₃ |

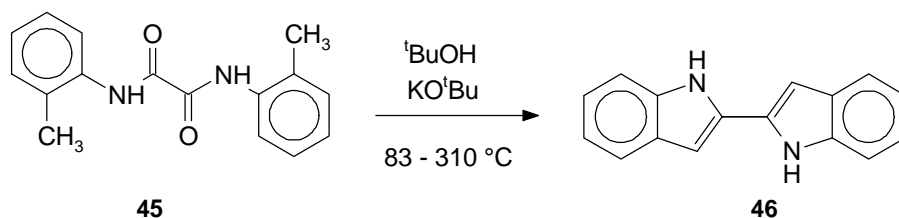
Im $^{13}\text{C-NMR-Spektrum}$ zeichnen sich die Signale von C5 und C4 dadurch aus, daß sie keine *para*-ständigen Protonen besitzen und somit als scharfe Dubletts auftreten. Die anderen vier Signale des Benzolkerns sind verbreitert. Am Signal der Methylgruppe läßt sich eine $^3J_{\text{C,H}}$ -Kopplung zum C3-Proton ablesen (4,9 Hz).

Tab. 57: Signallage und Kopplungen im ^{13}C -NMR-Spektrum von 45

45

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|----------------------------------|-------------------|
| 157,63 | s | 2 x CO |
| 134,31 | s | 2 x C1 |
| 130,69 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 158,1$ Hz | 2 x C3 |
| 128,45 | s | 2 x C2 |
| 126,98 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 161,6$ Hz | 2 x C5 |
| 125,81 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 161,6$ Hz | 2 x C4 |
| 121,23 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 162,3$ Hz | 2 x C6 |
| 17,44 | q, $^1J_{\text{C,H}} = 126,9$ Hz | 2 x CH_3 |

4.4.2 2,2'-Bisindol (46)

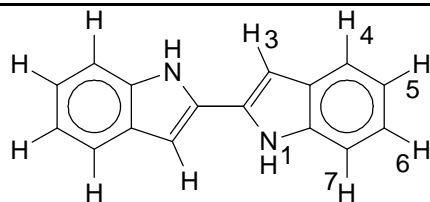


45

46

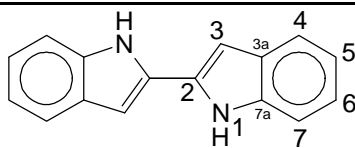
Die Reaktion wird unter Schutzgas nach einer Vorschrift von Bergman et al. (1995) durchgeführt. *N,N'*-Di-*o*-tolylloxalamid wird mit Kalium-*t*-butanolat in *t*-Butanol aufgeschlämmt. Bis zum Ende der Reaktion wird ein leichter Schutzgasstrom über das Reaktionsgemisch geleitet und gerührt. Das Gemisch wird erhitzt, bis das ganze *t*-Butanol überdestilliert ist; bei weiterer, sukzessiver Erhitzung verflüssigt sich das Gemisch, schäumt auf und färbt sich leicht braun, es bilden sich farblose, leichte Flocken, die vom Schutzgasstrom mitgerissen werden, bis die Masse bei 300 – 310 °C schließlich Blasen wirft und leicht schäumt. Man läßt dann auf Raumtemperatur abkühlen, gibt Wasser zum Reaktionsgemisch und zentrifugiert die entstehende Suspension ab. Der Rückstand wird mit Ethanol gewaschen und dreimal aus einem Dioxan/Essigsäureanhydrid-Gemisch (5:3) umkristallisiert. Man erhält 2,2'-Bisindol als beigefarbene Kristallnadeln in guter Ausbeute.

Die Zuordnung im ^1H -NMR-Spektrum erfolgt analog zur nichtgestrichenen Molekülhälfte von 2-(indol-3-yl)-indol (Bocchi und Palla, 1984) und stimmt mit Bergman et al. (1995) überein.

Tab. 58.: Signallage und Kopplungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **46****46**

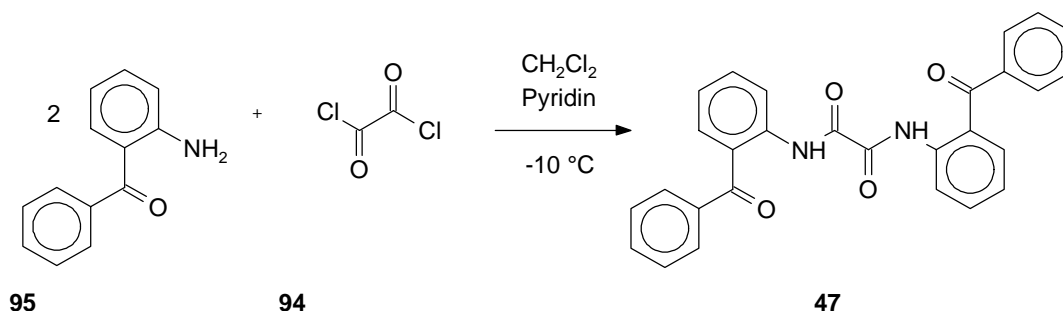
| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|-----------|
| 11,55 | s | 2 x N1H |
| 7,56 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,6$ Hz | 2 x C4H |
| 7,41 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,4$ Hz | 2 x C7H |
| 7,12 | pt | 2 x C6H |
| 7,01 | pt | 2 x C5H |
| 6,93 | s | 2 x C3H |

Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum erfolgt die Zuordnung der Signale analog zur nichtgestrichenen Molekülhälfte von 2,3'-Bisindol (Bocchi und Palla, 1984). Eine eindeutige Zuordnung kann aber nur bei drei Signalen erfolgen. Die Signallagen stimmen mit jenen in Bergman et al. (1995) überein, ohne daß dort eine Zuordnung vorgeschlagen wäre.

Tab. 59: Signallage und Kopplungen im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von **46****46**

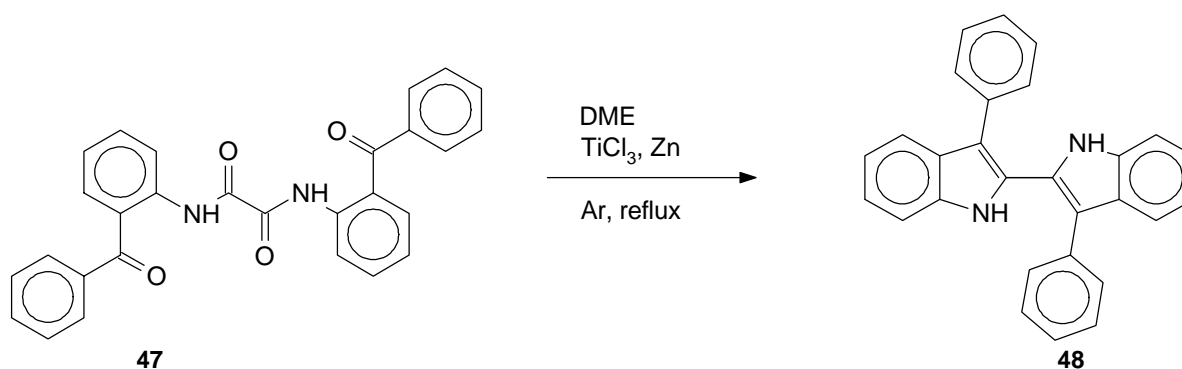
| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-------------------|----------------------------------|-------------------|
| 136,79 und 131,29 | 2 s | 2 x C3a, 2 x C7a |
| 128,32 | s | 2 x C2 |
| 121,56 und 119,91 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 162,8$ Hz | 2 x C5 und 2 x C4 |
| 119,28 und 110,93 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 161,6$ Hz | 2 x C4 und 2 x C6 |
| 119,28 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 157,8$ Hz | 2 x C6 |
| 110,93 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 156,0$ Hz | 2 x C7 |
| 98,28 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 169,9$ Hz | 2 x C3 |

4.4.3 *N,N'*-Bis(2-benzoylphenyl)-oxamid (**47**)



Unter Schutzgas wird zu einer gekühlten Lösung von 2-Aminobenzophenon (**95**) in Dichlormethan und Pyridin eine Lösung von Oxalylchlorid in Dichlormethan getropft. Die von Black et al. (1982) vorgeschlagene Durchführung in einer 50 %igen wäßrigen Methanollösung erschien nicht zweckmäßig. Es bildet sich bereits nach den ersten Tropfen eine farblose Suspension, die sich zunehmend eintrübt. Nach Beendigung der Reaktion fügt man 0,5 n Salzsäure hinzu und filtriert. Man wäscht den Rückstand mit 0,5 n Salzsäure, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und mit Wasser. Man erhält *N,N'*-Bis(2-benzoylphenyl)-oxamid (**47**) in guter Ausbeute als farblose, kristalline Substanz, die in dieser Reinheitsstufe in der nächsten Umsetzung eingesetzt wird.

4.4.4 3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol (**48**)



Die Reaktion wird unter Schutzgas nach einer Vorschrift von Fürstner et al. (1995) durchgeführt. Zinkstaub, Titantrichlorid und *N,N'*-Bis(2-benzoylphenyl)-oxamid werden in Dimethoxyethan (DME) suspendiert und unter Rühren zum Sieden erhitzt. Nach 3 Stunden Sieden läßt man auf Raumtemperatur abkühlen, filtriert über Kieselgel und spült mit Essigsäureethylester nach. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Nach Aufreinigung des Rückstands an Kieselgel und Abziehen des Lösungsmittels erhält man eine hellgelbe, kristalline Substanz. Aus einer Lösung in Essigsäureethylester (EE) durch Zugabe von Petrolether (PE, 40-70) ausgefällt, erhält man 3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol als farblose, kristalline Substanz in guter Ausbeute.

Lösungen von 3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol in Chloroform oder DMSO färben sich innerhalb kurzer Zeit intensiv gelb (innerhalb von Sekunden bei Raumtemperatur und Bestrahlung mit Sonnenlicht, innerhalb weniger Tage bei 4 °C und geringer Lichteinwirkung). Dies könnte auf eine Autoxidation unter Bildung eines 3-Hydroperoxy-3*H*-indols zurückzuführen sein, wie sie bei 3,3'-Dimethyl-2,2'-bisindol (**96**) beobachtet wurde. Auch dort ist die Autoxidation mit dem Auftreten eines gelben Farbtons verbunden (Britten und Smith, 1972).

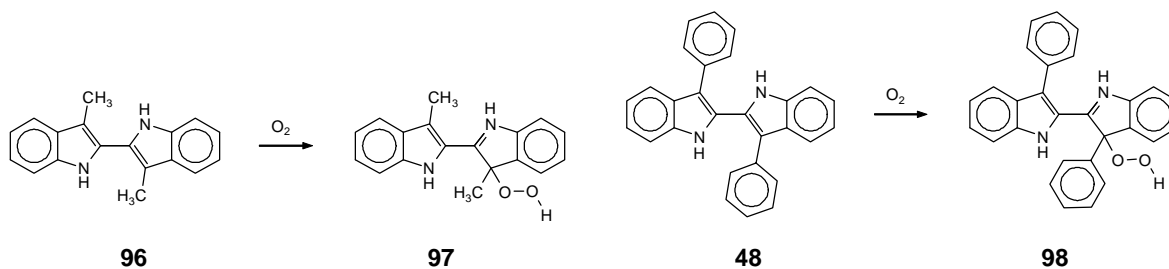
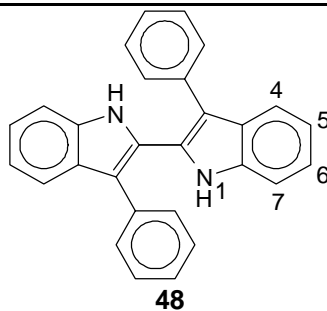


Abb. 71: An 3,3'-Dimethyl-2,2'-bisindol (**96**) beobachtete Autoxidation zu **97** (Britten und Smith, 1972).

Abb. 72: Diskutierbare Autoxidation von 3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol (**48**) zu **98**.

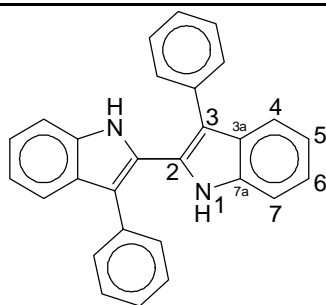
Die Zuordnungen im $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ erfolgen mit Hilfe des Spektrums von 2,2'-Bisindol. Die Signale der acht Protonen an den Indolresten verändern ihre Lage nicht wesentlich. Je weiter die Protonen in den Phenylresten von der Substitutionsstelle entfernt sind, desto weiter hochfeldverschoben sind ihre Resonanzen. So können auch sie unter Berücksichtigung der Integralwerte der Signale zugeordnet werden. Die Signallage stimmt mit Fürstner et al. (1995) überein.

Tab. 60: Signallage und Kopplungen im $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ von **48**



| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|--|
| 7,99 | s | 2 x N1H |
| 7,64 - 7,59 | m | 2 x C4H, 4 x <i>o</i> -Phenyl-H |
| 7,49 - 7,45 | m | 4 x <i>m</i> -Phenyl-H |
| 7,41 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,3$ Hz | 2 x C7H |
| 7,23 - 7,09 | m | 2 x C5H, 2 x C6H, 2 x <i>p</i> -Phenyl-H |

Im $^{13}\text{C-NMR-Spektrum}$ können die Signale der *ortho*- und *meta*-Kohlenstoffatome der Phenylsubstituenten an der erhöhten Intensität gegenüber allen anderen Signalen erkannt werden. Die anderen Signale werden, so weit möglich, mit Hilfe des $^{13}\text{C-NMR-Spektrums}$ von 2,2'-Bisindol zugeordnet. Das Signal der beiden Kohlenstoffatome C3 an den Indolgerüsten erfährt einen Tieffeldshift, der charakteristisch ist für eine Substitution mit einer Phenylgruppe (+17,65 ppm). Die Signale der verbleibenden wasserstofftragenden Indolkohlenstoffatome ändern ihre Lage nur geringfügig. Auch für C2, C3a und C7a ist keine wesentliche Veränderung zu erwarten, so kann das Dublett bei 127,21 ppm nur von den *para*-Kohlenstoffatomen und das Singulett bei 126,03 nur von den quartären Kohlenstoffatomen der Phenylsubstituenten stammen. Die Signallage stimmen mit Fürstner et al. (1995) überein.

Tab. 61: Signallage und Kopplungen im ^{13}C -NMR-Spektrum von **48****48**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-------------------------|--|--|
| 135,91; 134,42; 127,84 | 3 s | 2 x C2, 2 x C3a, 2 x C7a |
| 130,31 und 129,07 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 159,8$ Hz d, $^1J_{\text{C,H}} = 160,6$ Hz | <i>o</i> - und <i>m</i> -Phenyl-Cs (8H) |
| 127,21 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 163,6$ Hz | <i>p</i> -Phenyl-Cs |
| 126,03 | s | <i>i</i> -Phenyl-C |
| 123,18 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 159,8$ Hz | C5 |
| 120,46 und 119,45 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 159,0$ Hz d, $^1J_{\text{C,H}} = 159,8$ Hz | C4 und C6 |
| 115,93 | s | C3 |
| 110,94 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 161,0$ Hz | C7 |

4.5 Cyclovoltammetrie

Zur Untersuchung des Redoxverhaltens werden Indirubin und 5-Iodindirubin cyclovoltammetrisch untersucht.

Abb. 73 zeigt das Cyclovoltammogramm von Indirubin in Dimethylformamid. Es wurden mehrere Zyklen übereinander aufgezeichnet. Der erste Zyklus beginnt bei "**START**" in Richtung negativen Potentials. Die beiden Reduktionen des ersten Zyklus sind reversibel im Sinne der Cyclovoltammetrie und werden bei allen weiteren Zyklen bei den gleichen Potentialwerten durchlaufen. Das Halbwellenpotential ($E_{1/2}$) der **1. Reduktion** beträgt etwa -0,84 V, das Halbwellenpotential der **2. Reduktion** beträgt etwa -1,36 V. Beide Schritte sind auch bei langsamem Durchlauf (20 mV/s) noch völlig reversibel.

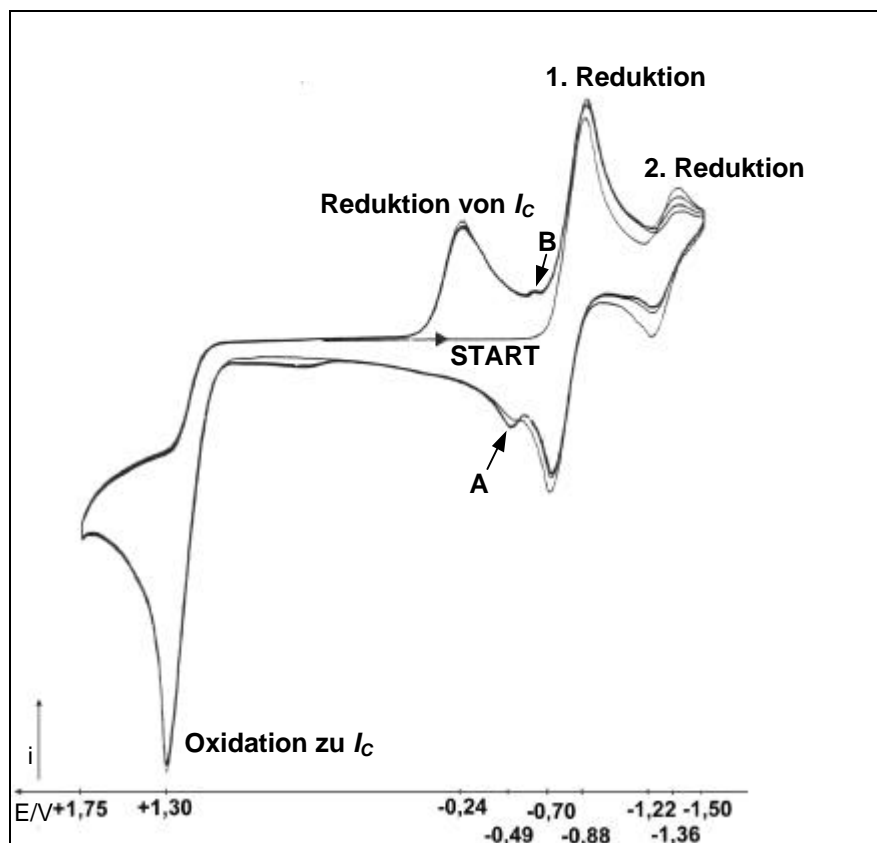


Abb. 73: Cyclovoltammogramm von Indirubin (**11**) in Dimethylformamid. + 1,75 bis - 1,50 V, 100 mV / s, 1 mA, Leitsalz (TBA)PF₆, mehrmaliger Durchlauf.

Mögliche Strukturen des reduzierten Indirubins sind in **Abb. 74** vorgeschlagen. Analog der Vorgänge bei der Reduktion von Indigo zu Leukoindigo (bzw. dessen Dianion), bei denen die Redoxeeigenschaften auf den Stammchromophor zurückzuführen sind (Klessinger und Lüttke, 1963; Hall und Elving, 1970; Bechthold et al., 1991) werden die beiden Elektronen wahrscheinlich in das konjugierte System des Stammchromophors, in die drei Doppelbindungen $O^2=C2-C3=C2'-C3'=O^3$ eingebracht, und es entsteht das Dianion des Leukoindirubins (**100**).

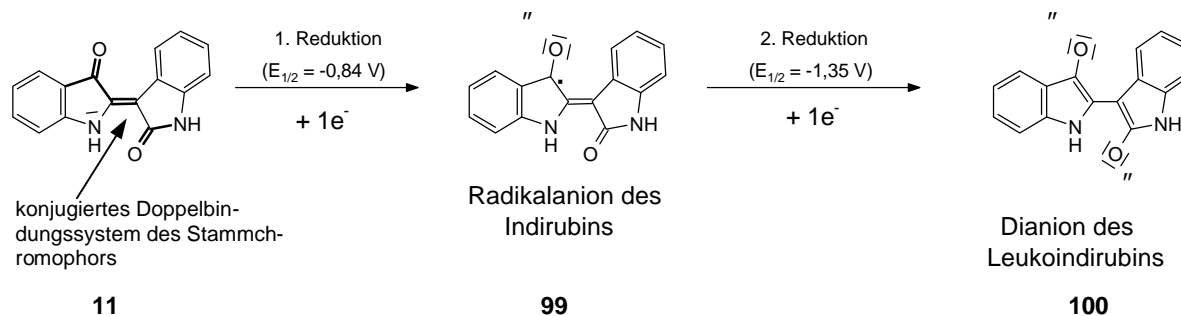


Abb. 74: Mögliche Produkte der Reduktion von Indirubin (**11**).

Bereits im ersten Durchlauf des Cyclovoltammogramms taucht im negativen Potentialbereich beim Rücklauf eine kleine Nebenwelle auf (Stelle **A** in **Abb. 73**). Sie könnte durch die Entstehung von (*E*)-Indirubin (*cis*-Indirubin) erklärt werden. In (*E*)-Indirubin liegen die beiden Carbonylsauerstoffatome "auf der selben Seite" der zentralen Doppelbindung (siehe **Abb. 75**). Möglicherweise ist die

Drehbarkeit um die Bindungsachse zwischen den beiden Indolresten (C3-C2') im Dianion des Leukoindirubins so weit möglich, daß bei einem kleinen Anteil von **100** vor der Rückoxidation die beiden Sauerstoffatome in die gleiche Richtung zeigen und sich so eine geringe Menge (*E*)-Indirubin bilden kann (**Abb. 75**).

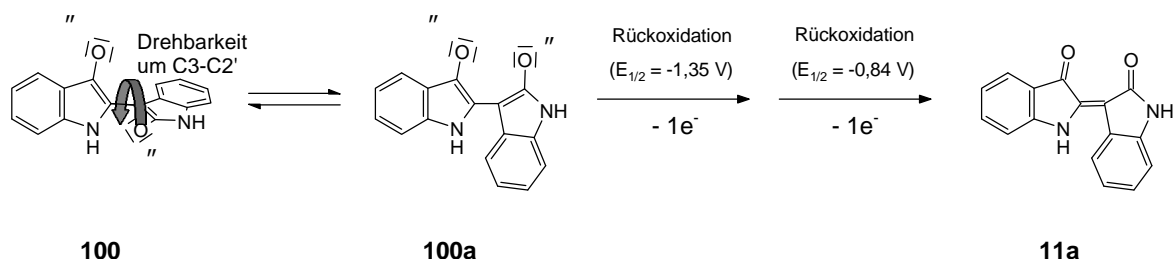


Abb. 75: Die Drehbarkeit um die Bindungsachse zwischen C3 und C2' ist im Dianion des Leukoindirubins (**100**) im Vergleich zur Doppelbindung in Indirubin (**11**) stark gesteigert. Ein kleiner Anteil des Dianions liegt deswegen möglicherweise vor der Rückoxidation in der "syn-Form" (**100a**) vor und bildet bei der Rückoxidation (*E*)-Indirubin (*cis*-Indirubin) (**11a**).

Die Oxidation bei $E_{Ox} \approx +1,3 \text{ V}$ ist im Sinne der Cyclovoltammetrie irreversibel, das heißt das Produkt der Oxidation reagiert weiter, so daß nach Umkehrung der Richtung der Spannungsänderung und Erreichen des entsprechenden Potentials die entsprechende Reduktionswelle fehlt. Dieser Teil des Cyclovoltammogramms, also der linke Teil vom Spannungsnullpunkt ausgehend, zeigt das typische Bild einer sogenannten *ECE*-Reaktion (vgl. Speiser, 1981). Bei dem *ECE*-Mechanismus folgt auf einen elektrochemischen Schritt (*E*) ein rein chemischer (*C*) und darauf wieder ein elektrochemischer (*E*). Dabei wird das Produkt der chemischen Reaktion leichter oxidiert als die Ausgangsverbindung, also unmittelbar nach der Bildung weiter oxidiert. In **Abb. 76** sind die hypothetischen Vorgänge dargestellt.

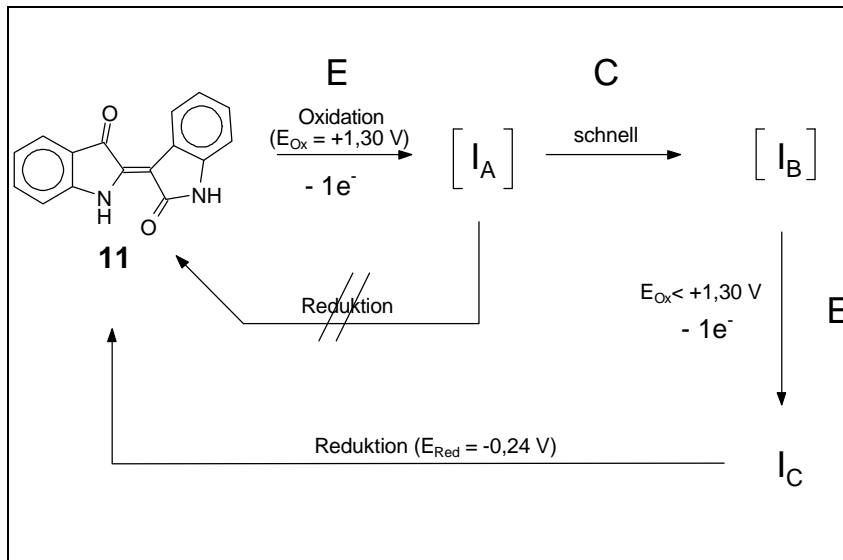


Abb. 76: Mögliche Beschreibung der Vorgänge an der Elektrode bei der Oxidationswelle und der Reduktionswelle des Folgeprodukts I_C . Indirubin (**11**) wird zu I_A oxidiert. Während die Spannung weiter wächst, reagiert I_A in einem chemischen Schritt weiter zu I_B . Sobald I_B entsteht, wird es weiter zu I_C oxidiert, weil I_B leichter umgesetzt wird als Indirubin. Ist die chemische Reaktion sehr schnell, bleibt kein I_A mehr in der Lösung zurück, bis die Vorschubrichtung der Spannung geändert wird. Da von dem hypothetischen I_A nichts mehr vorhanden ist, wird keine entsprechende Reduktionswelle für die Reaktion $I_A \rightarrow$ Indirubin (**11**) gefunden. Statt dessen wird I_C bei $E = -0,24\text{ V}$ wieder zu Indirubin (**11**) reduziert. I_A und I_B sind in **Abb. 73** nicht zu sehen.

Die *ECE*-Schrittfolge findet man bei nahezu allen elektronentransferinduzierten chemischen Reaktionen. Dazu zählen unter anderem Isomerisierungen, Kupplungen, Substitutionen, Additionen oder Eliminierungen. Im Idealfall findet man eine einzige, irreversible Welle mit doppelt so hohem Strom wie bei der Ein-Elektron-Übertragung. (Heinze, 1984). Dies ist beim Cyclovoltammogramm von Indirubin der Fall. Die Reaktion läuft schnell ab, selbst bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 200 mV/s (**Abb. 77**) findet man keine Andeutung einer Reduktionswelle.

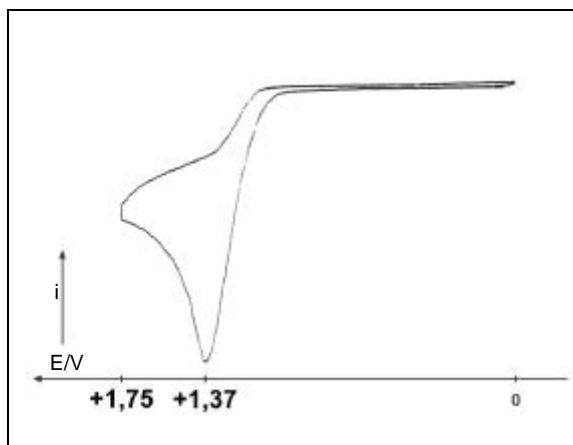


Abb. 77: Cyclovoltammogramm der Oxidation von Indirubin (**11**). Vorschubgeschwindigkeit 200 mV/s . Selbst bei dieser hohen Vorschubgeschwindigkeit bleibt der Vorgang im Sinne der Cyclovoltammetrie irreversibel. Das Peakminimum verschiebt sich leicht zu höheren Werten.

Das hypothetische I_C erzeugt wahrscheinlich den Peak bei niedrigerem Potential (**Folgeprodukt I_C** , $E_{Red}(I_C) = -0,24\text{ V}$), der beim ersten Durchlauf des Zyklus noch nicht vorhanden war. Bei dieser Reduktion des Folgeprodukts I_C könnte dann wieder Indirubin entstehen, da der weitere Verlauf des

Cyclovoltammogramms dem ersten Durchlauf entspricht. Möglicherweise haben die hypothetischen Oxidationsprodukte I_A , I_B und I_C die in **Abb. 78** angegebene Struktur.

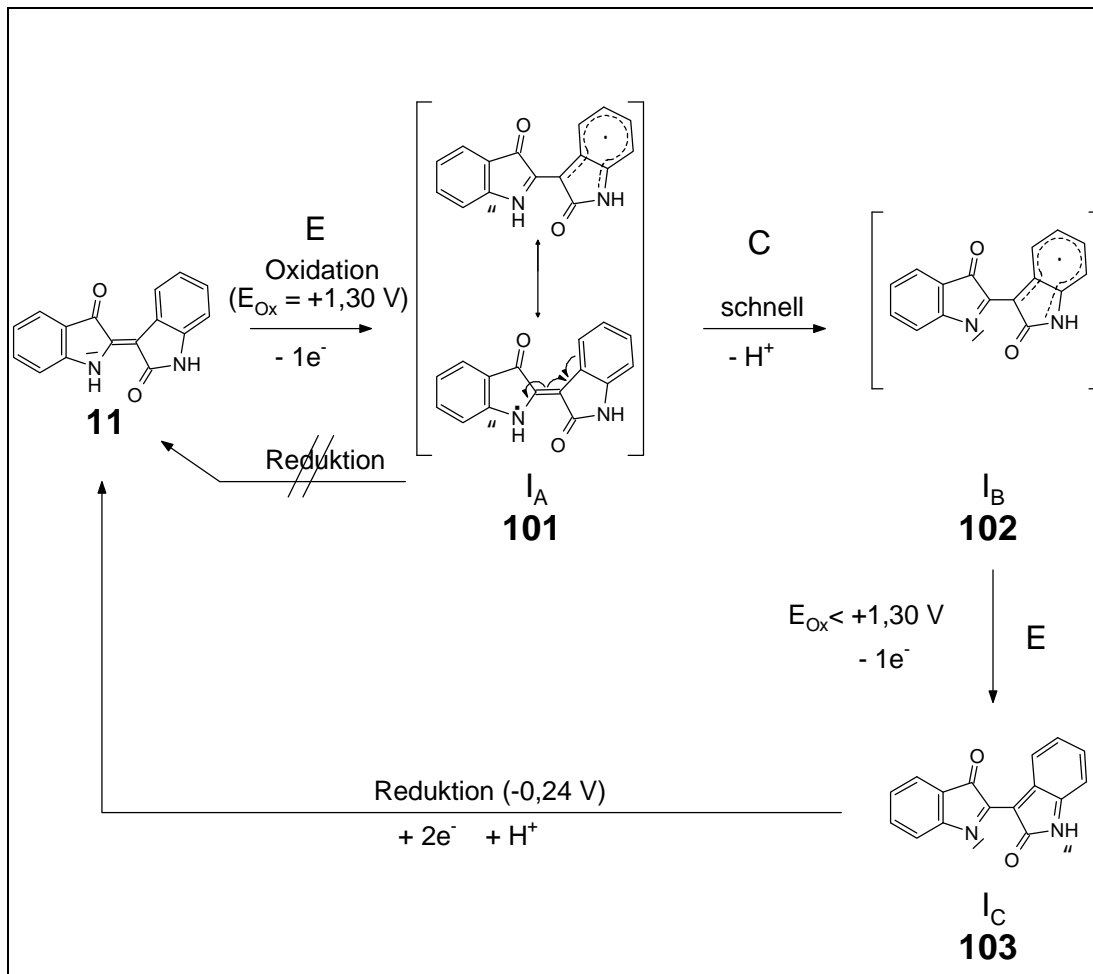


Abb. 78: Mögliche Strukturvorschläge für die Oxidationsprodukte I_A (**101**), I_B (**102**) und I_C (**103**). Die hypothetische schnelle chemische Reaktion C zwischen den beiden elektrochemischen Reaktionen E könnte eine Deprotonierung sein.

5-Iodindirubin zeigt ein sehr ähnliches Cyclovoltammogramm. Lediglich die zweite Reduktion findet bei etwas niedrigerem Potential statt. Dies ist möglicherweise auf den Effekt des elektronenziehenden Iodsubstituenten zurückzuführen.

Tab. 62: Ergebnisse der cyclovoltammetrischen Messungen an Indirubin (11) und 5-Iodindirubin (90) Glas-Kohlenstoff-Elektrode (GC, *glass-carbon-electrode*); Vergleichselektrode: Kalomelektrode, Leitsalz: (TBA)PF₆, 0,1 M in Dimethylformamid; -1,5 bis +1,75 V; 100 mV/s; 0,5 mA - 1 mA

| | 1.Reduktion | 2.Reduktion | 1.Oxidation |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Indirubin (11) | reversibel | reversibel | irreversibel |
| | $E_{1/2} = -0,84 \text{ V}$ | $E_{1/2} = -1,35$ | $E_{Ox} = + 1,23 \text{ V}$ |
| | $E_{Red} = -0,92 \text{ V}$ | $E_{Red} = -1,43 \text{ V}$ | $E_{Red} = -0,25$ |
| | $E_{Ox} = -0,75 \text{ V}$ | $E_{Ox} = -1,26 \text{ V}$ | |
| 5-Iodindirubin (90) | reversibel | reversibel | irreversibel |
| | $E_{1/2} = -0,76 \text{ V}$ | $E_{1/2} = -1,23$ | $E_{Ox} = + 1,25 \text{ V}$ |
| | $E_{Red} = -0,83 \text{ V}$ | $E_{Red} = -1,30 \text{ V}$ | $E_{Red} = -0,25$ |
| | $E_{Ox} = -0,69 \text{ V}$ | $E_{Ox} = -1,15 \text{ V}$ | |

Indirubin und 5-Iodindirubin liegen mit ihren Halbwellenpotentialen der Reduktion zum Anionradikal ($E_{1/2} = -0,84 \text{ V}$ bzw. $-0,76 \text{ V}$) in einem Bereich mit zahlreichen chinonartigen Strukturen. So hat zum Beispiel 1,4-Benzochinon ein Peakpotential von $-0,54 \text{ V}$ (in Acetonitril vs. SCE), 9,10-Anthrachinon ein Halbwellenpotential von $-1,01 \text{ V}$ (in DMF vs. SCE) und Ubichinon-6 ein Peakpotential von $-1,05 \text{ V}$ (in Acetonitril vs. Ag/0,01 M Ag⁺) (Lide, 1995). Die Toxizität von Chinonderivaten, darunter auch einige chemotherapeutisch wirksame Substanzen, wie zum Beispiel Doxorubicin oder Mitomycin C, konnte mit der enzymatischen oder nichtenzymatischen Bildung der korrespondierenden Semichinone und der darauffolgenden Reaktion mit molekularem Sauerstoff zu reaktiven Sauerstoffspezies durch spontane Rückbildung des Chinonsystems in Verbindung gebracht werden (Sartorelli, 1982; Kappus, 1986; Merk und Jugert, 1991). Solch ein *Redoxcycling* kann dazu führen, daß die Detoxifizierungskapazität der Zelle für toxische Sauerstoffspezies überschritten wird und eine Schädigung der Zelle eintritt. Ob ein solches *Redoxcycling* zum Wirkmechanismus der Indirubinderivate beiträgt, müßten weitergehende Untersuchungen zeigen. Zumindest liegt jedoch die erste Reduktion mit $E_{1/2} \approx -0,8 \text{ V}$ in einem Bereich, der physiologisch zugänglich sein sollte.

Außerdem hätte eine Überführung in eine der oben vorgeschlagenen oxidierten oder reduzierten Strukturen mit großer Wahrscheinlichkeit eine bessere Löslichkeit und damit eine erhöhte Transportfähigkeit in wäßrigen Systemen zur Folge. Daß durch Redoxvorgänge eine Überführung in vermutlich besser wasserlösliche Strukturen möglich ist, konnte somit gezeigt werden.

Denkbar ist auch eine Metabolisierung der Indirubinderivate durch die noch wenig untersuchten und in ihrer Bedeutung noch wenig verstandenen Carbonyl-Reduktions-Enzyme, wie zum Beispiel die Carbonylreductase (EC 1.1.1.184) oder die Indanoldehydrogenase (EC 1.1.1.112), von denen gezeigt werden konnte, daß sie auch Xenobiotika reduzieren (Maser, 1995).

4.6 Ethidiumbromidverdrängungsassay

Die von Wu et al. 1982 erhaltenen Hinweise einer "nichtkovalenten" Wechselwirkung zwischen Indirubin und der DNA lassen sich, wie in Kapitel 2.6 erläutert, als Interkalation interpretieren. Um das zu überprüfen, wurde die Interkalationsfähigkeit der Indirubinderivate mit dem Ethidiumbromidverdrängungsassay bestimmt.

Für Indirubin und 5-Iodindirubin konnten in früheren Untersuchungen aufgrund der geringen Löslichkeit keine IC_{50} -Werte für die Verdrängung von Ethidiumbromid aus der DNA bestimmt werden (Niederberger, 1998). Der Assay wurde für die Substanzen, die im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert wurden dennoch durchgeführt, da bei einigen Derivaten eine bessere Löslichkeit zu erwarten gewesen war.

Ethidium weist im interkalierten Zustand infolge der hydrophoben Umgebung einen Anstieg der Fluoreszenz um etwa das 25-fache auf. Der Protonenaustausch wird verlangsamt, dies führt zu einer Verlängerung der Lebenszeit des angeregten Zustands. Die Affinität von interkalierenden Substanzen zur DNA kann durch die Verdrängung von Ethidium aus der DNA bestimmt werden. Man mißt die Abnahme der Ethidiumfluoreszenz als Funktion der Substanzkonzentration und setzt sie mit der Anfangsfluoreszenz ins Verhältnis. Der ED_{50} -Wert, jene Substanzkonzentration, die die Ethidiumfluoreszenz auf 50 % reduziert, ist dabei in etwa umgekehrt proportional zur Bindungskonstanten zwischen Substanz und DNA (Morgan et al., 1979).

Die Messungen werden an isolierter Kalbsthymus-DNA durchgeführt. Mit einem Fluoreszenzspektrometer wird die Fluoreszenzintensität des interkalierten Ethidiums bei 546 nm (Anregung) und 595 nm (Emission) bestimmt. Der so erhaltene Wert wird auf 100 % gesetzt. Man gibt die zu untersuchende Substanz in definierten Schritten zu und mißt jeweils nach einigen Minuten erneut. Daneben wird eine eventuelle Eigenfluoreszenz der Substanz in der gleichen Lösung (ohne DNA) bestimmt und gegebenenfalls von der Fluoreszenzintensität mit DNA abgezogen. Der so erhaltene Wert wird jeweils zur Fluoreszenzintensität ohne Substanzzugabe ins Verhältnis gesetzt.

5-Fluorindirubin, Indirubin-3'-oxim und Indirubin-5-sulfonamid erweisen sich mit ED_{50} -Werten um 5 μM als Substanzen, die Ethidiumbromid relativ stark verdrängen. Die Werte wurden jeweils durch Doppelbestimmungen bestätigt. Drei Indirubinsulfonsäurederivate bewegen sich in ihrer Fähigkeit, Ethidiumbromid zu verdrängen in einem ED_{50} -Bereich von 10 - 20 μM . Eine Reihe weiterer Indirubinderivate zeigen mit $3 \times 10 \mu\text{M}$ nur noch eine schwache Verdrängungsfähigkeit. Noch weniger interkalierend wirken die anderen Bisindole Indigo, Isoindigo sowie die beiden Indirubinderivate Indirubin-5-sulfonsäure und 1-Phenylindirubin, deren ED_{50} -Werte in einem Bereich zwischen 40 und 60 μM liegen.

Die Ergebnisse wurden zugunsten besserer Übersichtlichkeit in vier Grafiken aufgeteilt. Die Positivkontrolle Doxorubicin ist stets mit abgebildet. In **Tab. 63** sind die ED₅₀-Werte angegeben.

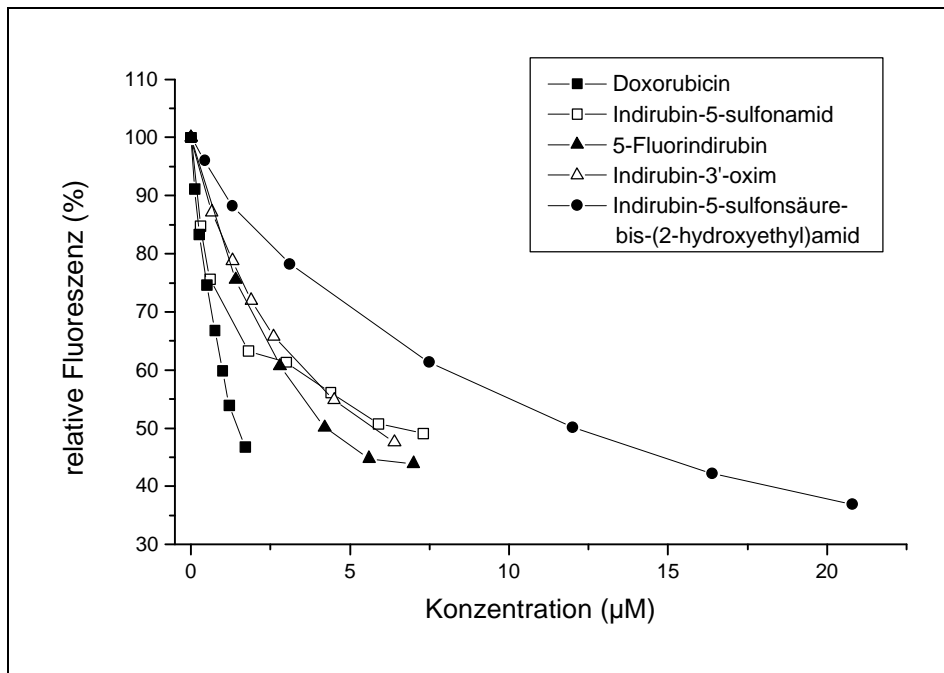


Abb. 79: Ethidiumbromidverdrängungsassay, die vier Indirubinderivate mit dem stärksten Vermögen, Ethidiumbromid von der DNA zu verdrängen, Doxorubicin dient als Positivkontrolle

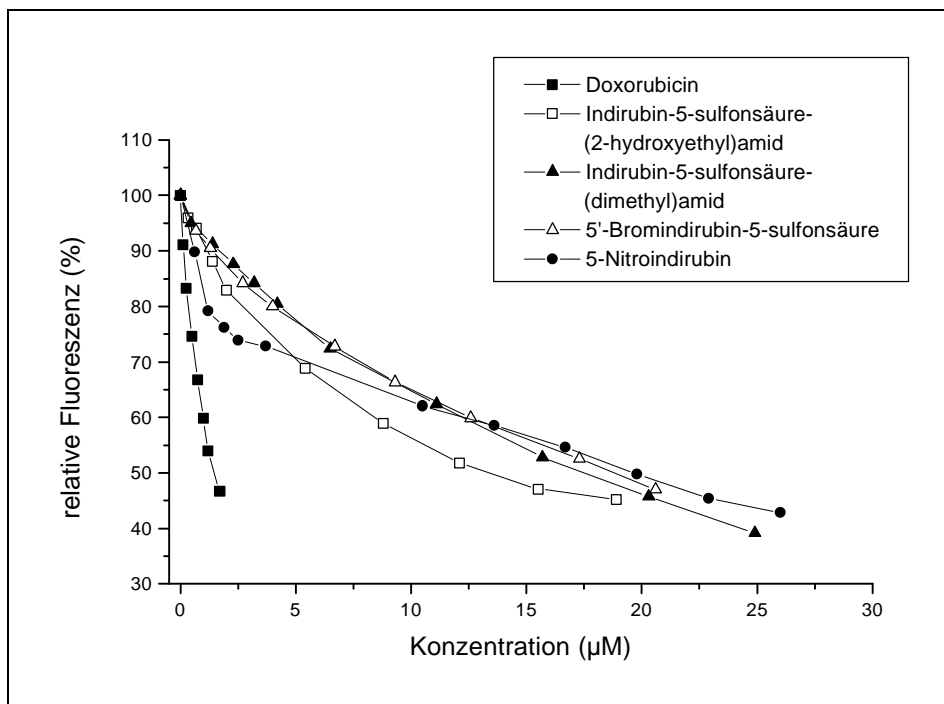


Abb. 80: Ethidiumbromidverdrängungsassay, vier Indirubinderivate mit mittlerem Vermögen, Ethidiumbromid von der DNA zu verdrängen, Doxorubicin dient als Positivkontrolle

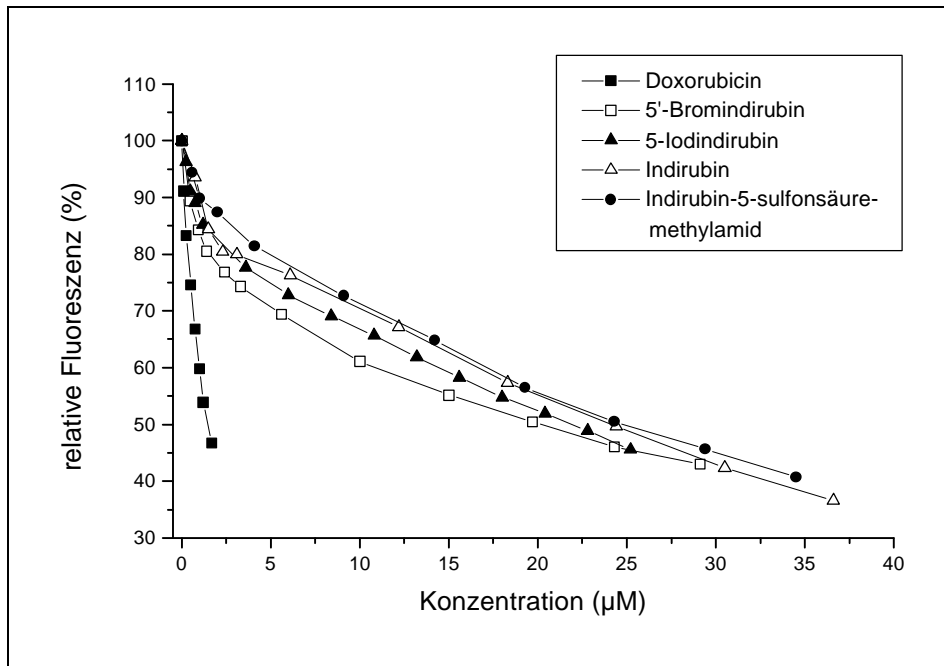


Abb. 81: Ethidiumbromidverdrängungsassay, vier Indirubinderivate mit schwachem Vermögen, Ethidiumbromid von der DNA zu verdrängen, Doxorubicin dient als Positivkontrolle

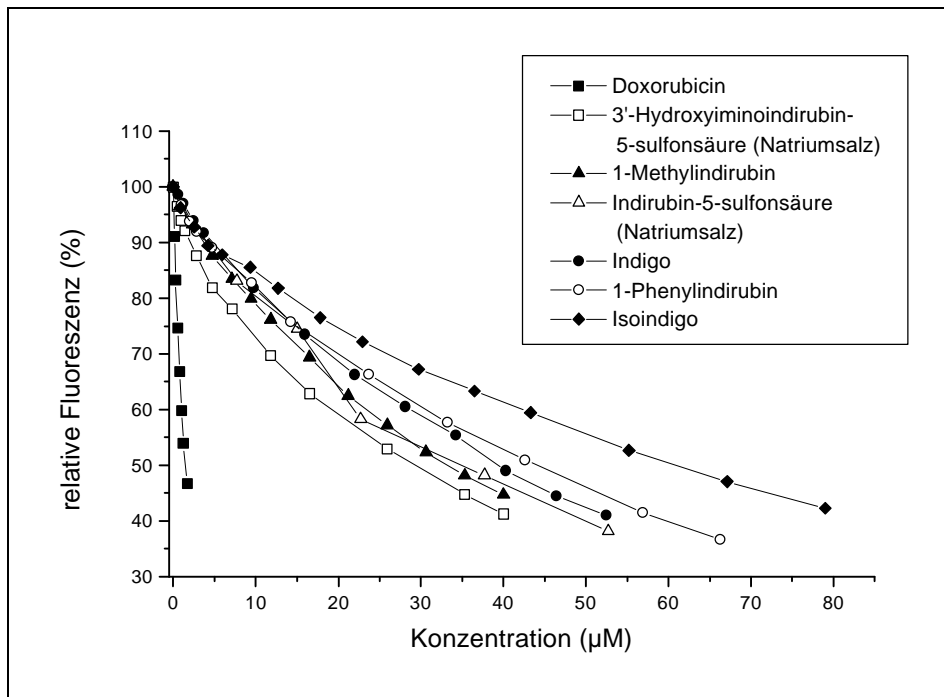


Abb. 82: Ethidiumbromidverdrängungsassay, vier Indirubinderivate, Indigo und Isoindigo. Die Substanzen sind nur in sehr geringem Maß fähig, Ethidiumbromid von der DNA zu verdrängen

Tab. 63: ED₅₀-Werte zur Ethidiumbromidverdrängung aus Kalbsthymus-DNA

| Substanz | ED ₅₀ (µM) |
|---|-----------------------|
| Doxorubicin (Positivkontrolle) | 2 |
| 5-Fluorindirubin (62) | 5 |
| Indirubin-3'-oxim (87) | 5 |
| Indirubin-5-sulfonamid (72) | 5 |
| Indirubin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid (86) | 1 x 10 |
| Indirubin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid (82) | 2 x 10 |
| Indirubin-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid (77) | 2 x 10 |
| 5'-Bromindirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (69a) | 2 x 10 |
| 5-Nitroindirubin (65) | 2 x 10 |
| 5-Iodindirubin (90) | 2 x 10 |
| 5'-Bromindirubin (67) | 2 x 10 |
| Indirubin (11) | 2 x 10 |
| Indirubin-5-sulfonsäuremethylamid (75) | 3 x 10 |
| 3'-Hydroxyiminoindirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (92a) | 3 x 10 |
| 1-Methylindirubin (25) | 3 x 10 |
| Indirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (29b) | 4 x 10 |
| Indigo (12) | 4 x 10 |
| 1-Phenylindirubin (28) | 4 x 10 |
| Isoindigo (13) | 6 x 10 |
| 5-Chlorindirubin (33) | - ¹⁾ |
| 5-Bromindirubin (31) | - ¹⁾ |
| 5-Methylindirubin (36) | - ¹⁾ |
| 5,5'-Dibromindirubin (68) | - ¹⁾ |
| 5-Iodindirubin-3'-oxim (91) | - ²⁾ |
| 2,2'-Bisindol (46) | - ³⁾ |
| 3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol (48) | - ³⁾ |

^{1),2),3)} ED₅₀-Wert ist nicht bestimmbar: ¹⁾ Substanz fällt bereits niedrigeren Konzentrationen aus, ²⁾ Fluoreszenzwerte schwanken selbst nach mehreren Minuten erheblich ³⁾ zu starke Eigenfluoreszenz.

Die Ergebnisse liefern ein starkes Indiz dafür, daß Indirubinderivate fähig sind, in die DNA zu interkalieren. Einige Derivate erreichen mit ihren ED₅₀-Werten sogar fast die Größenordnung des starken Interkalators Doxorubicin.

4.7 Die Hemmung des Enzymkomplexes CDK1/Cyclin B

Die Untersuchungen zur Hemmung von Enzymen des Zellzyklus wurden von Sophie Leclerc in der Arbeitsgruppe von Dr. Laurent Meijer, am Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Station Biologique, Roscoff, Frankreich durchgeführt.

Der Enzymkomplex CDK1/Cyclin B wird aus Eizellen des Seesterns (*Marthasterias glacialis*), die sich in der M-Phase befinden, durch Affinitätschromatographie an p9^{CKShs1} auf Sepharose als Träger-

matrix gewonnen. Die Elution erfolgt durch freies $p9^{CKShs1}$ (Meijer et al., 1997). gemessen wird die Übertragung radioaktiver Phosphatgruppen auf Histon H1 in Gegenwart von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. Nach Beendigung der Inkubation und Aufarbeitung wird mittels Flüssigszintillation die Radioaktivität bestimmt. Die Phosphorylierungsaktivität der Kinase wird in pmol Phosphat, das in Histon H1 pro 10 min Inkubation eingebaut wird oder in Prozent der maximalen Aktivität ausgedrückt.

Die Substanzklasse der Indirubine zeigt eine selektive Hemmwirkung auf die Enzymkomplexe CDK1/Cyclin B, CDK2/Cyclin A und CDK4/Cyclin D1. Isoindigo zeigt eine nur sehr geringe Aktivität. Die Substanzklasse der Isatine zeigt, mit Ausnahme von 5-Chlorisatin, das eine geringe Aktivität aufweist, in diesem Testsystem keine Wirkung. Indigo, sulfonierte Indigoderivate, 2,2'-Bisindol und 3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol sind ebenfalls inaktiv.

Indirubin hemmt CDK1/Cyclin B mit einem IC_{50} -Wert von $10\ \mu\text{M}$. Halogensubstitution in Position 5 führt zu einer Steigerung der Inhibierung bis um das 30-fache: der IC_{50} -Wert von 5-Iodindirubin beträgt $0,3\ \mu\text{M}$. Ein Sulfonatrest in 5-Position steigert die Hemmwirkung um den Faktor 180: das Natriumsalz der Indirubin-5-sulfonsäure hat einen IC_{50} -Wert von $0,055\ \mu\text{M}$.

Eine zweite Stelle im Indirubingerüst, an der eine Variation zu einer Steigerung der Inhibierungsfähigkeit führt, ist die Position 3'. Die Einführung einer Oximfunktion an dieser Stelle, führt zu einer Steigerung um den Faktor 55: Indirubin-3'-oxim hat einen IC_{50} -Wert von $0,18\ \mu\text{M}$. Die Vermutung, daß eine Kombination dieser Substituenten eine weitere Wirkungssteigerung bewirken müßte, bestätigte sich. 5-Iodindirubin-3'-oxim hat einen IC_{50} -Wert von $0,030\ \mu\text{M}$, das Natriumsalz der 3'-Hydroxyiminoindirubin-5-sulfonsäure hat einen IC_{50} -Wert von $0,0083\ \mu\text{M}$. Ausgehend von der Leitstruktur Indirubin wurde so eine Wirkungssteigerung um den Faktor 330 bzw. 1200 erreicht.

Tab. 64: IC₅₀-Werte (µM) der Indirubinderivate und von Isoindigo (**13**) an den Enzymkomplexen CDK1/Cyclin B, CDK2/Cyclin A und an cdc25

| Substanz | CDK1/Cyclin B | cdc25 | CDK2/Cyclin A |
|---|-------------------|------------------|---------------|
| 3'-Hydroxyiminoindirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (92a) | 0,0083 | nb | nb |
| 5-Iodindirubin-3'-oxim (91) | 0,030 | nb | nb |
| Indirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (29b) | 0,055 | 110 | 0,035 |
| 5'-Bromindirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (69a) | 0,090 | nb | nb |
| Indirubin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid (86) | 0,090 | nb | nb |
| Indirubin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid (82) | 0,10 | nb | nb |
| Indirubin-5-sulfonamid (72) | 0,16 | nb | nb |
| Indirubin-3'-oxim (87) | 0,18 | nb | 0,44 |
| 5-Iodindirubin (90) | 0,30 | 130 | nb |
| 5-Bromindirubin (31) | 0,35 | 32 | nb |
| 5-Chlorindirubin (33) | 0,40 | 55 | 0,75 |
| 5-Methylindirubin (36) | 0,80 | 60 | nb |
| Indirubin-5-sulfonsäuremethylamid (75) | 1,4 | nb | nb |
| 5-Fluorindirubin (62) | 2,0 | 70 | nb |
| Indirubin-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid (77) | 2,0 | nb | nb |
| 5-Nitroindirubin (65) | 2,2 | 60 | nb |
| 5'-Bromindirubin (67) | 6,5 | nb | nb |
| 6-Iodindirubin ¹⁾ | 6,5 ¹⁾ | 35 ¹⁾ | nb |
| 5,5'-Dibromindirubin (68) | 7,0 | nb | nb |
| Indirubin (11) | 10 | 150 | nb |
| 1-Methylindirubin (25) | >10 | nb | nb |
| 1-Phenylindirubin (28) | 1000 | nb | nb |
| Isoindigo (13) | 80 | nb | nb |

¹⁾Thommet (1998); nb = nicht bestimmt.

Tab. 65: IC₅₀-Werte (µM) von Indigo-, Isatin- und Indoxylacetatderivaten sowie zweier 2,2'-Bisindolderivate am Enzymkomplex CDK1/Cyclin B und an cdc25

| Substanz | CDK1/Cyclin B | cdc25 |
|---|-------------------|--------------------|
| Indigo (11) | >1000 | 500 |
| Indigo-5,5',7,7'-tetrasulfonsäure (Tetrakaliumsalz) | >1000 | 130 |
| Indigo-5,5',7-trisulfonsäure (Trikaliumsalz) | >1000 | 60 |
| Indigocarmin | 400 | >1000 |
| 5-Chlorisatin (32) | 40 | 300 |
| 5-Bromisatin (30) | 100 | 275 |
| 6-Iodisatin ¹⁾ | 100 ¹⁾ | >100 ¹⁾ |
| Isatin-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid (77) | 350 | nb |
| Isatin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid (81) | 400 | >100 |
| 5-Iodisatin | 500 | 400 |
| 5-Methylisatin (63) | 700 | >1000 |

| | | |
|---|-------|-------|
| Isatin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) | 700 | >1000 |
| 5-Fluorisatin (61) | 800 | 500 |
| Isatin (10) | 900 | >1000 |
| 5-Nitroisatin (64) | 1000 | 400 |
| 1-Methylisatin (60) | >1000 | >1000 |
| 1-Phenylisatin (26) | >1000 | >1000 |
| 3-Indoxylacetat (19) | >1000 | nb |
| 5-Brom-3-indoxylacetat (66) | 500 | nb |
| 3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol (48) | 400 | 150 |
| 2,2'-Bisindol (46) | 1000 | 200 |

¹⁾Thommet (1998); nb = nicht bestimmt.

Die Indirubinderivate zeigen außerdem eine hohe Selektivität für CDK1 gegenüber anderen Kinasen. In **Tab. 66** sind drei Indirubinderivate einigen bekannten CDK1-Hemmstoffen gegenüber gestellt. Indirubin-3'-oxim zeigt für CDK1 gegenüber einigen PKC-Isoenzymen eine Selektivität bis über den Faktor 550, hemmt allerdings die Caseinkinase I mit einem IC₅₀-Wert von 0,60 µM. Das Natriumsalz der Indirubin-5-sulfonsäure hemmt die CDK1 sogar über 1800 mal besser als alle untersuchten PKC-Isoenzyme, und auch gegenüber anderen Kinasen ist es hochselektiv (PKA: Faktor 18000, PKG: Faktor 8700, Insulin-Rezeptor Tyrosinkinase: Faktor 5800). Im Vergleich dazu hemmt Staurosporin zwar mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich die CDK1, allerdings ebenfalls eine ganze Reihe weiterer Kinasen, darunter die Proteinkinase A, die Proteinkinase C, die Proteinkinase G, die src-Tyrosinkinase und andere. Eine gewisse Selektivität zeigen Butyrolacton-I (Kitagawa et al., 1993), Flavopiridol (Lowski et al., 1994) und Roscovitin (Meijer et al., 1996). CDK1 wird von Flavopiridol 15 mal stärker gehemmt als beispielsweise die PKC, von Roscovitin etwa 150 mal stärker und von Butyrolacton-I 260 mal stärker. Zwei mit Roscovitin verwandte Substanzen, zeigen eine ähnlich hohe Selektivität (Gray et al., 1998) wie die Indirubinderivate. CDK1 ist beispielsweise gegenüber Purvalanol A 2500 mal empfindlicher als die PKC.

Innerhalb der Familie der CDKs ist die Selektivität der Indirubinderivate allerdings nur wenig ausgeprägt (**Tab. 66**). Die größte Selektivität zeigte hier bisher das Natriumsalz der Indirubin-5-sulfonsäure, das den Enzymkomplex CDK1/Cyclin B fünfmal stärker und CDK2/Cyclin A neun mal stärker hemmt als CDK4/Cyclin D1. Purvalanol A ist innerhalb der CDKs wesentlich selektiver, es hemmt CDK1/Cyclin B 210 mal stärker als CDK4/Cyclin D1 (Gray, 1998). Durch gezieltes *Drug-Design* oder durch den Einsatz kombinatorischer Methoden und den Aufbau geeigneter Substanzbibliotheken sollten bei den Indirubinderivaten noch Wirkungs- und Selektivitätssteigerungen zu erwarten sein.

Tab. 66: Selektivitäten von CDK-Hemmstoffen. Vergleich verschiedener bekannter CDK-Hemmstoffe mit den Indirubin-derivaten Indirubin-3'-oxim (**87**), Indirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (**29b**) und 3'-Hydroxyimino-indirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (**92a**) (Die IC₅₀-Werte wurden, falls nicht anders vermerkt, in der Arbeitsgruppe von Dr. Laurent Meijer, am Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Station Biologique, Roscoff, Frankreich durchgeführt.)

| Enzym | Staurosporin (56a) ^{1), 2)} | UCN-01 (56b) ³⁾ | Butyrolacton-I (49) ⁴⁾ | Flavopiridol (59a) ⁵⁾ | Roscovitin (53) ⁶⁾ | Purvalanol A (54a) ⁷⁾ | 87 | 29b | 92a |
|--------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|------------|--------------------|--------|
| CDK1/ Cyclin B | 0,003-0,006 ^{1), 2)} | 0,031 ³⁾ | 0,60 ⁴⁾ | 0,40 | 0,65 ⁶⁾ | 0,004 ⁷⁾ | 0,18 | 0,055 | 0,0083 |
| CDK2/ Cyclin A | nb | 0,030 ³⁾ | 1,50 ⁴⁾ | 0,40 ¹⁾ | 0,70 ⁶⁾ | 0,070 ⁷⁾ | 0,44 | 0,035 | nb |
| CDK4/ Cyclin D1 | 3-10 ¹⁾ | 0,032 ³⁾ | nb | 0,40 ¹⁾ | >100 ⁶⁾ | 0,85 ⁷⁾ | 3,3 | 0,15 | nb |
| cdc25 | nb | nb | nb | nb | nb | nb | nb | 110 | nb |
| MAPK | nb | 0,910 ³⁾ | 94 ⁴⁾ | nb | 30 ⁶⁾ | 9,0 ⁷⁾ | >100 | nb | nb |
| PKA | 0,008 ¹⁾ | nb | 260 ⁴⁾ | 145 ⁵⁾ | >1000 ⁶⁾ | 9,0 ⁷⁾ | 6,3 | >1000 | nb |
| PKG | 0,009 ^{1), 2)} | nb | nb | nb | >1000 ⁶⁾ | >10 ⁷⁾ | 9,0 | 480 | nb |
| PKC | 0,003 ^{1), 2)} | 0,007 ³⁾ | 160 ⁴⁾ | 6 ⁵⁾ | >100 ⁶⁾ | >10 ⁷⁾ | 4,0 - >100 | >100 ⁸⁾ | nb |
| EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase | 0,63 ¹⁾ | nb | >590 ⁴⁾ | 25 ⁵⁾ | nb | nb | nb | nb | nb |
| Casein-Kinase I | | | schwacher Effekt ⁴⁾ | | nb | >3,3 ⁷⁾ | 0,60 | 10,0 | nb |
| Casein-Kinase II | | | schwacher Effekt ⁴⁾ | | nb | >10,0 ⁷⁾ | 12 | 1,5 | nb |
| Insulin-Rezeptor-Tyrosinkinase | 0,061 ^{1), 2)} | nb | | | 70 ⁶⁾ | 5,0 ⁷⁾ | 11 | 320 | nb |
| src-Tyrosinkinase | 0,006 ¹⁾ | nb | | | 250 ⁶⁾ | nb | nb | 3,8 | nb |

¹⁾Meijer (1995), ²⁾Gadbois et al. (1992), ³⁾Kawakami et al. (1996), ⁴⁾Kitagawa et al. (1993), ⁵⁾Losiewicz et al. (1994), ⁶⁾Meijer et al. (1996), ⁷⁾Gray et al. (1998), ⁸⁾PKC β2 wird mit einem IC₅₀-Wert von 6,5 μM gehemmt; nb = nicht bestimmt

4.8 Colony-Forming-Assay / Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus

4.8.1 Ergebnisse des Colony-Forming-Assays

Die in dieser Arbeit synthetisierten Substanzen wurden im Colony-Forming-Assay untersucht. Die Untersuchungen wurden von Dr. Thomas Roth bei Oncotest GmbH, Freiburg durchgeführt.

Die soliden, humanen Tumorxenografts aus der Nacktmaus werden mechanisch zerkleinert und aus den Tumorstückchen durch Inkubation mit Enzymcocktail und Abfiltrieren durch Siebe verschiedener Porengröße eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen werden dann in 24-Loch-Platten in Agarlösung kultiviert. Nach einem Tag bei 37 °C im Inkubator wird Substanzlösung zugegeben. Die Platten werden dann zur Ausbildung der Kolonien aus den Tumorstammzellen für 6-18 Tage inkubiert. Die Inkubationszeit richtet sich nach der Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Tumorstammzellen. Durch Vergleich der Anzahl der Kolonien in der unbehandelten Kontrolle und den mit Substanz behandelten Proben, werden die T/C-Werte (Anzahl der Kolonien in den behandelten Proben dividiert durch die Anzahl der Kolonien in der Kontrolle, *test versus control group value*) und IC₅₀-, IC₇₀- und IC₉₀-Werte berechnet (Fiebig und Berger, 1992; Fiebig et al. 1987). Der IC₅₀-Wert kennzeichnet jene Substanzkonzentration, bei der die Anzahl der Kolonien um 50 % gehemmt wird, also die Anzahl der Kolonien in den behandelten Proben 50 % der Anzahl in der Kontrolle beträgt. Entsprechend bedeuten IC₇₀-Wert und IC₉₀-Wert, daß bei diesen Substanzkonzentrationen das Wachstum um 70 % bzw. 90 % gehemmt wird, die Anzahl der Kolonien in den behandelten Proben also nur noch 30 % bzw. 10 % von der Kontrolle beträgt.

Folgende humane Tumorxenografts (XF) wurden verwendet: Blasen tumoren (BXF 1299 und BXF 1301), colorectale Tumoren (CXF 280 und HT 29F), Adenokarzinome der Lunge (LXFA 289 und LXFA 526), ein großzelliges Lungenkarzinom (LXFL 529), ein kleinzelliges Lungenkarzinom (LXFS 650), Brusttumoren (MAXF, MX 1 und MCF 7X), Melanome (MEXF 514, 515, 276 und 989), Ovarialtumoren (OVXF 899 und 1353), Pankreastumoren (PAXF 546 und 736) und Nierentumoren (RXF 1220 und 944LX).

Zunächst wird für alle Zelllinien der IC₇₀-Wert in µM bestimmt und der Mittelwert errechnet. In einem Balkendiagramm wird dann untereinander für jede einzelne Zelllinie in logarithmischer Skala die Abweichung von diesem Mittelwert angegeben. Zeigt der Balken nach links, bedeutet dies, daß die entsprechende Zelllinie sensitiver reagiert als der Durchschnitt, zeigt er nach rechts, reagiert die entsprechende Zelllinie unempfindlicher als der Durchschnitt. Neben der Information, die der Mittelwert über die allgemeine Wirksamkeit der Substanz gibt, kann das Wirkprofil, das sich durch die Auftragung der einzelnen Abweichungen vom Mittelwert ergibt, Hinweise auf zellinien spezifische Eigenschaften liefern, die den Stoff jeweils besser oder schlechter wirken lassen und somit Indizien für den Wirkmechanismus sein können.

Tab. 67: Mittelwerte der IC₇₀-Werte über alle Zelllinien im Colony-Forming-Assay für Isoindigo (**13**) und die Indirubinderivate

| Substanz | IC ₇₀ -Mittelwert (µM) |
|---|-----------------------------------|
| Isoindigo (13) | 4 |
| Indirubin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid (82) | 13 |
| Indirubin-3'-oxim (87) | 14 |
| 5-Iodindirubin-3'-oxim (91) | 17 |
| 5-Fluorindirubin (62) | 20 |
| Indirubin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid (86) | 20 |
| 5-Bromindirubin (31) | 21 |
| 5-Chlorindirubin (33) | 23 |
| 5-Iodindirubin (90) | 27 |
| 5-Methylindirubin (36) | 27 |
| Indirubin (11) | 27 |
| 6-Iodindirubin ¹⁾ | 31 |
| 5-Nitroindirubin (65) | 32 |
| 5'-Bromindirubin (67) | 47 |
| Indirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (29b) | 53 |
| 5,5'-Dibromindirubin (68) | 67 |
| 5'-Bromindirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (69a) | 83 |
| 3'-Hydroxyiminoindirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (92a) | 88 |
| 1-Phenylindirubin (28) | > 10 |
| Indirubin-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid (77) | kein Effekt |
| Indirubin-5-sulfonsäuremethylamid (75) | kein Effekt |

¹⁾Thommet (1998); nb = nicht bestimmt

Indirubin, 5-Iodindirubin, 5-Bromindirubin, 5-Chlorindirubin, 5-Fluorindirubin und 5-Methylindirubin zeigen sehr ähnliche Wirkprofile. Einer eher geringen durchschnittlichen Wirksamkeit (20 - 30 µM) steht eine hohe Sensitivität der Zelllinie MCF 7X gegenüber (IC₇₀ = 1 µM). Auch Indirubin (mittlerer IC₇₀-Wert = 97 µM) und **5-Nitroindirubin** (mittlerer IC₇₀-Wert = 32 µM) zeigen, wenn auch weniger ausgeprägt, dieses Wirkprofil.

| IN-VITRO EFFECT | | | IN HUMAN TUMOR XENOGRAFTS | | | | 12.08.97 08:31:14 | | |
|----------------------------|------------------|----------------------|---|------|-----|------|--------------------|--------------------|--------------------|
| TUMOR/ PASSAGE NO. | EXP. NO. | COL ONY CONTR. | Distribution of IC70 related to Mean log.scaled axis | | | | IC50 | IC70 | IC90 |
| | | | *0.01 | *0.1 | *10 | *100 | ug/ml | ug/ml | ug/ml |
| | | | Mean 26.711 | | | | | | |
| BXF 1299/24 1301/13 | X1808M X1818M | 27 184 | . | . | . | . | >30.000 >30.000 | >30.000 >30.000 | >30.000 >30.000 |
| CKF 280/8 HT29X/2 | X2028M X2128M | 102 200 | . | . | . | . | >30.000 <1.000 | >30.000 14.422 | >30.000 62.402 |
| LXFA 526/6 | X1888M | 459 | . | . | . | . | 21.917 | 62.402 | >30.000 |
| LXFL 529/11 | X1778M | 94 | . | . | . | . | >30.000 | >30.000 | >30.000 |
| LXFS 650/9 | X199EM | 574 | . | . | . | . | 29.999 | 74.941 | >30.000 |
| MAXF MX1/20 MCF7X/28 | X1928M X218FM | 91 196 | . | . | . | . | >30.000 <1.000 | >30.000 1.211 | >30.000 34.416 |
| MEXF 514/10 989/5 | X1798M X1878M | 75 88 | . | . | . | . | 29.072 19.188 | 54.466 27.846 | >30.000 40.411 |
| OVXF 899/30 1353/14 | X2038M X1788M | 82 27 | . | . | . | . | >30.000 1.000 | >30.000 >30.000 | >30.000 >30.000 |
| PAXF 546/2 736/18 | X2228M X2218M | 36 35 | . | . | . | . | 15.428 15.428 | 27.507 27.507 | 49.042 49.042 |
| RXF 1220/4 | X2138M | 199 | . | . | . | . | 13.601 | 32.756 | 78.883 |
| Mean | | n=16 | | | | | 13.215 | 26.711 | 50.439 |

Abb. 83: Wirkprofil von 5-Methylindirubin (**36**) im Colony-Forming-Assay. Ähnliche Wirkprofile zeigen Indirubin (**11**), 5-Iodindirubin (**90**), 5-Bromindirubin (**31**), 5-Chlorindirubin (**33**), 5-Fluorindirubin (**62**) und 5-Nitroindirubin (**65**).

Indirubin-5-sulfonsäure hat mit einem durchschnittlichen IC_{70} -Wert von 53 μM eine geringe Wirksamkeit und zeigt auch im Wirkprofil keine herausragenden Einzelwerte. Dies ist ein für eine ionische Verbindung trotz der sehr starken Hemmwirkung auf den Enzymkomplex CDK1/Cyclin B, die am isolierten Enzym beobachtet wurde, nicht überraschendes Ergebnis. Selbst wenn die Wirkung von Indirubin-5-sulfonsäure auf der Hemmung dieser Enzymkomplexe beruht, muß bei Versuchen am intakten zellulären System wie zum Beispiel dem Colony-Forming-Assay die Zellmembran und eventuell auch die Kernmembran durchdrungen werden, bevor der Stoff an seinem Target anlangt. Dies ist für ionische Substanzen ohne einen aktiven Transportmechanismus sehr schwierig.

Indirubin-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid weist bis zu Konzentrationen von 30 μM an keiner der Zelllinien einen Effekt auf.

Indirubin-3'-oxim (87) und 5-Iodindirubin-3'-oxim haben mit einem IC_{70} -Wert von etwa 15 μM eine moderate Wirksamkeit und stellen die im Schnitt am besten wirksamen Indirubinderivate dar. Beide Derivate bewirken an den beiden Melanomen MEXF 989 und MEXF 515LX eine drei- bis fünf-fach stärkere Wachstumshemmung ($IC_{70} = 3 - 6 \mu\text{M}$) verglichen mit dem Mittelwert. Indirubin-3'-oxim ist außerdem an der Lungenadenokarzinomzelllinie LXFA 289 verstärkt wirksam (3 μM), 5-Iodindirubin-3'-oxim dagegen an der Blasen-tumor-Zelllinie BXF 1301 (6 μM).

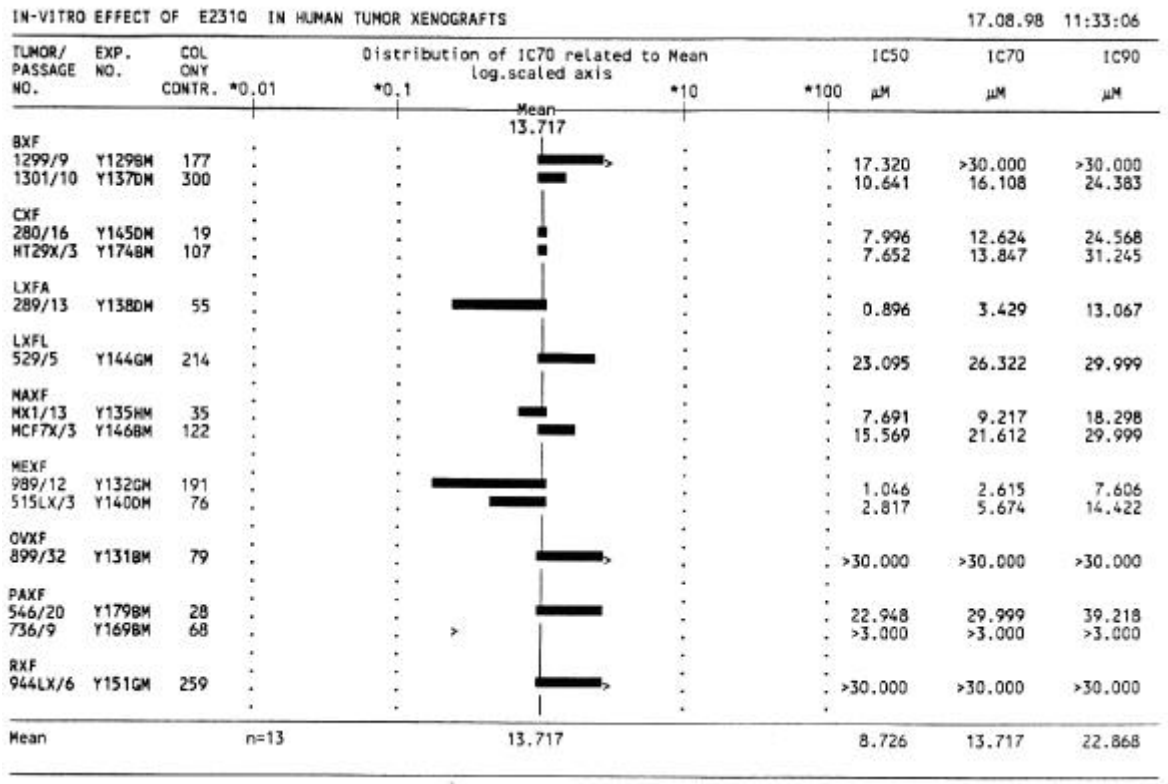


Abb. 84: Wirkprofil von Indirubin-3'-oxim (87) im Colony-Forming-Assay.

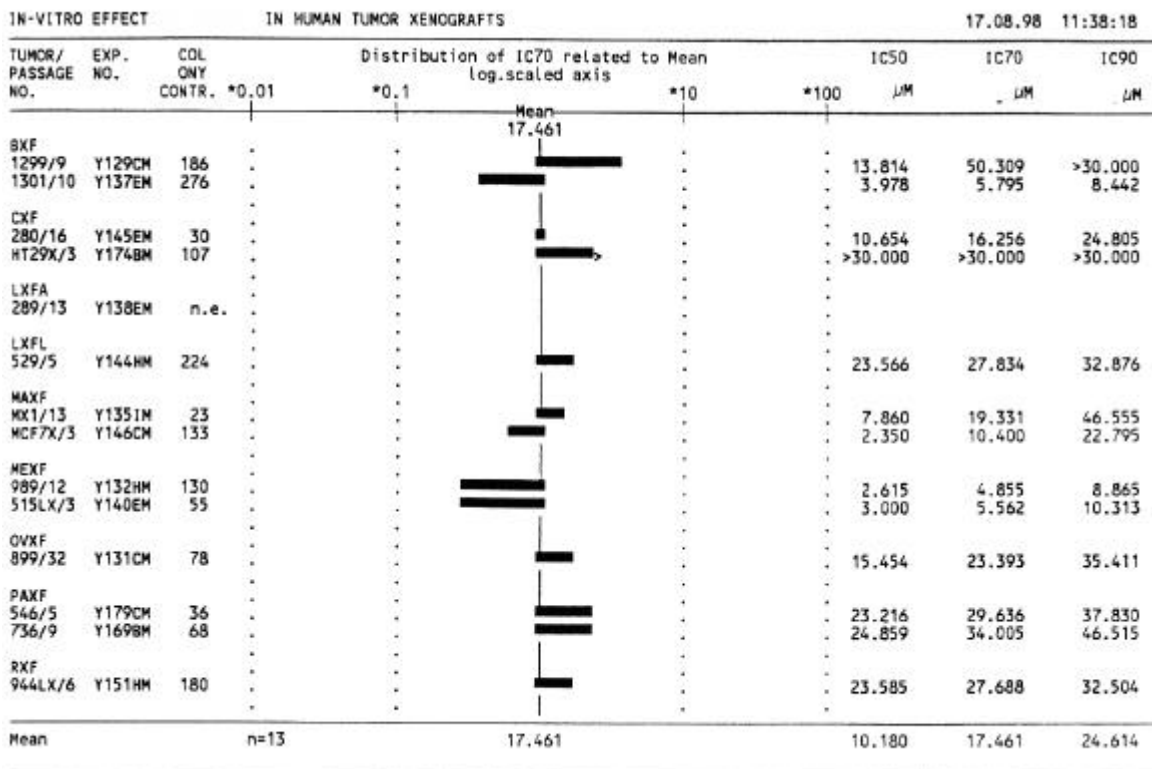


Abb. 85: Wirkprofil von 5-Iodindirubin-3'-oxim (91) im Colony-Forming-Assay.

Isoidindigo zeigt die beste Wirksamkeit mit einem durchschnittlichen IC₇₀-Wert von 4 µM. Dabei liegt bei acht Zelllinien (HT 29X, LXFS 650, MX-1, MCF 7X, MEXF 989, OVXF 1353, PAXF 546, PAXF 736) der IC₇₀-Wert im Bereich der niedrigsten getesteten Konzentration (1 µM). Vier Zelllinien

(BXF 1299, LXFA 526, MEXF 514, RXF 1220) sind mit IC_{70} -Werten von 40 - 90 μM kaum sensitiv gegen Isoindigo. Auffällig ist der starke Unterschied der beiden Melanomzelllinien MEXF 989 und MEXF 514. MEXF 989 reagiert etwa 40 mal empfindlicher auf die Behandlung mit Isoindigo als MEXF 514. Eine Parallele zeigt sich interessanterweise bei *in vivo*-Untersuchungen, in denen die Sensitivität von subkutan in der Nacktmaus wachsenden Tumorexografts auf 16 verschiedene Zytostatika getestet wurde (Fiebig und Berger, 1992). Das Wachstum des Tumors aus MEXF 989-Zellen konnte dabei durch einige Substanzen gebremst werden. Durch Vincristin, Vindesin und Dacarbazin konnte sogar ein Rückgang der Tumorgroße erreicht werden. Dagegen konnte das Wachstum des Tumors aus MEXF 514-Zellen durch keine der getesteten 16 Zytostatika in ihrem Tumorstadium beeinflusst werden.

Einen umgekehrten Effekt beobachtet man bei 3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol (Abb. 91), auf das MEXF 514 etwa 20 mal empfindlicher reagiert als MEXF 989.

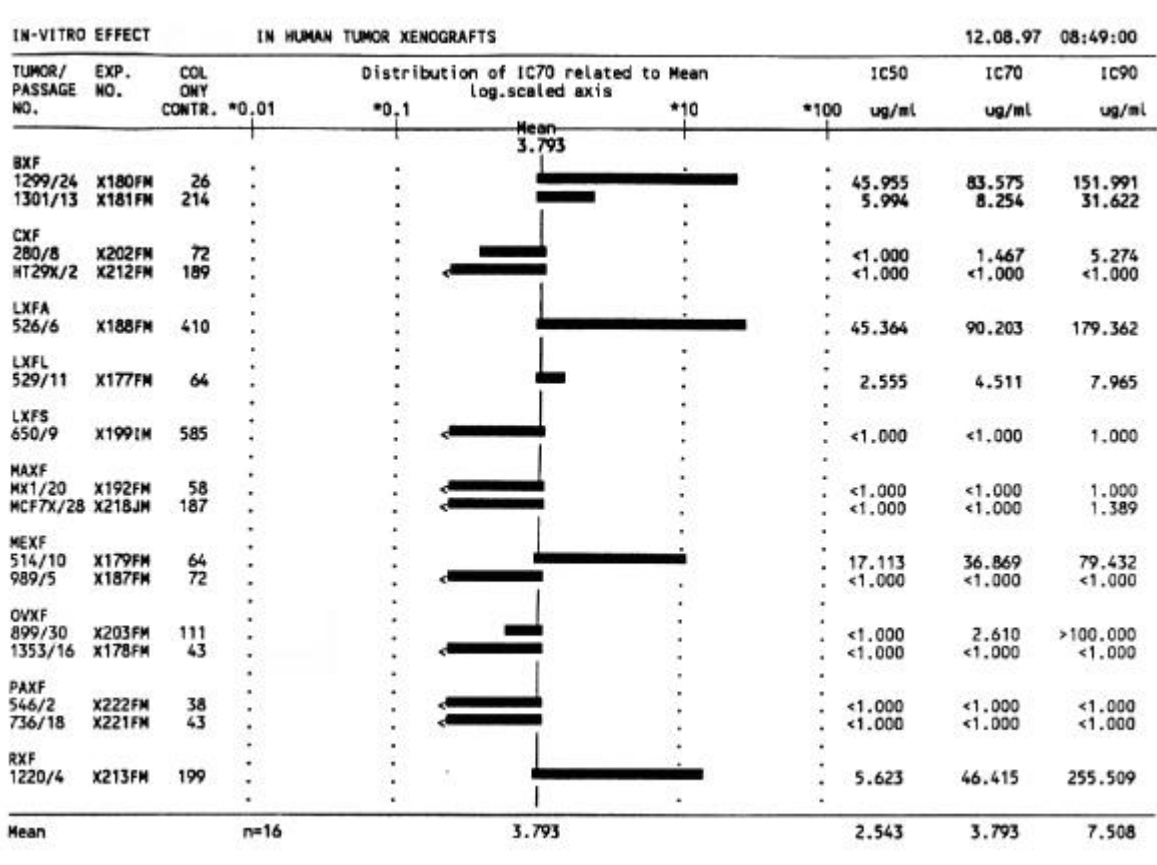


Abb. 86: Wirkprofil von Isoindigo (13) im Colony-Forming-Assay.

5'-Bromindirubin und **5,5'-Dibromindirubin** zeigen mit durchschnittlichen IC_{70} -Werten von 47 μM bzw. 67 μM im Mittel eine nur sehr schwache Wirksamkeit. Beide haben jedoch ein ausgeprägtes Wirkspektrum (Abb. 87), in dem besonders die Melanomzelllinie MEXF 989 mit IC_{70} -Werten unter 1 μM heraussticht. Auch die Mammakarzinomzelllinie MCF 7 ist mit 6 μM bzw. 12 μM relativ sensitiv. **5'-Bromindirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (69a)** zeigt an fast allen Zelllinien einen IC_{70} -

Wert von über 100 μM aber auch einen herausstechenden IC_{70} -Wert am Melanom MEXF 989 von 4 μM . Die starke Empfindlichkeit der Melanomzelllinie MEXF 989 als einzige Zelllinie, kann aber auch ein falsch positives Ergebnis sein, das zum Beispiel daher rührt, daß die Zellen bei der Aufarbeitung Schaden genommen haben. Daher ist zur Absicherung in diesen Fällen eine Wiederholung des Assays notwendig.

| IN-VITRO EFFECT | | | IN HUMAN TUMOR XENOGRAPHS | | | | 28.11.97 12:39:12 | | |
|----------------------------------|------------------|----------------------|---|------|----------------|-----|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| TUMOR/ PASSAGE NO. | EXP. NO. | COL ONY CONTR. | Distribution of IC_{70} related to Mean log.scaled axis | | | | IC_{50} μM | IC_{70} μM | IC_{90} μM |
| | | | *0.01 | *0.1 | Mean 66.922 | *10 | | | |
| BXF 1299/4 1301/16 | X292BM X289BM | 101 54 | . | . | . | . | 168.761 >100.000 | >100.000 >100.000 | >100.000 >100.000 |
| CXF 280/11 HT29X/2 | X284BM X285BM | 31 170 | . | . | . | . | 74.989 39.810 | 133.352 >100.000 | 237.137 >100.000 |
| LXFA 289/9 526/7 | X296BM X279BM | 106 463 | . | . | . | . | >100.000 27.122 | >100.000 >100.000 | >100.000 >100.000 |
| LXFL 529LX/2 | X288BM | 35 | . | . | . | . | >100.000 | >100.000 | >100.000 |
| MAXF MX1/7 MCF7LX/29X280BM | X294KM X294KM | 28 336 | . | . | . | . | 6.968 4.108 | 25.118 11.699 | 116.591 >100.000 |
| MEXF 514/12 989/8 | X281BM X278BM | 307 28 | . | . | . | . | 10.926 <1.000 | 64.223 <1.000 | >100.000 1.000 |
| OVXF 899/28 1353/18 | X314BM X282BM | 111 49 | . | . | . | . | >100.000 162.596 | >100.000 271.227 | >100.000 >100.000 |
| PA 546/5 736/5 | X298BM X286BM | 64 101 | . | . | . | . | >100.000 >100.000 | >100.000 >100.000 | >100.000 >100.000 |
| RXF 1220/2 | X299BM | 71 | . | . | . | . | 56.234 | 237.137 | >100.000 |
| Mean | | n=16 | | | 66.922 | | 39.764 | 66.922 | 79.910 |

Abb. 87: Wirkprofil von 5,5'-Dibromindirubin (**68**) im Colony-Forming-Assays. Ein ähnliches Wirkprofil zeigt 5'-Bromindirubin (**67**).

Indirubin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid ist eine der wirksamsten Substanzen (mittlerer IC_{70} -Wert = 13 μM). Auch sie zeigt wieder ein ausgeprägtes Wirkspektrum mit einem herausragenden IC_{70} -Wert für die Melanomzelllinie MEXF 989 von 0,4 μM bei gleichzeitiger Unwirksamkeit an der Melanomzelllinie MEXF 515. Der Unterschied zwischen zwei Melanomzelllinien ist damit noch größer als bei Isoindigo. MEXF 989 reagiert über 75 mal stärker als MEXF 515.

Auch die Mammakarzinomzelllinie MCF 7 erfährt, wie bei einigen anderen, in 5-Position substituierten Indirubinderivaten (**Abb. 88**), eine starke Wachstumshemmung mit einem IC_{70} -Wert von 2 μM .

| IN-VITRO EFFECT | | | IN HUMAN TUMOR XENOGRAFTS | | | | 17.08.98 11:41:30 | | | |
|---------------------------|------------------|----------------------|---|------|----------------|-----|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| TUMOR/ PASSAGE NO. | EXP. NO. | COL ONY CONTR. | Distribution of IC70 related to Mean log.scaled axis | | | | IC50 | IC70 | IC90 | |
| | | | *0.01 | *0.1 | Mean 13.110 | *10 | *100 | ug/ml | ug/ml | ug/ml |
| BXF 1299/9 1301/10 | Y129EM Y137GM | 149 279 | . | . | | . | . | 50.832 >30.000 | >30.000 >30.000 | >30.000 >30.000 |
| CXF 280/16 HT29X/3 | Y145GM Y174DM | 26 89 | . | . | | . | . | 12.009 >30.000 | 17.320 >30.000 | 24.980 >30.000 |
| LXFA 289/13 | Y138GM | 24 | . | . | | . | . | 1.161 | 3.563 | >30.000 |
| LXFL 529/5 | Y144JM | 232 | . | . | | . | . | 44.067 | >30.000 | >30.000 |
| MAXF MX1/13 MCF7X/3 | Y135KM Y146EM | 30 104 | . | . | | . | . | >10.000 0.617 | >10.000 2.059 | >10.000 >30.000 |
| MEXF 989/12 515LX/3 | Y132JM Y140GM | 92 68 | . | . | | . | . | <0.100 >30.000 | 0.405 >30.000 | 4.529 >30.000 |
| OVXF 899/32 | Y131EM | 100 | . | . | | . | . | >30.000 | >30.000 | >30.000 |
| PAXF 546/5 73 | Y179EM Y169DM | 28 41 | . | . | | . | . | >1.000 >30.000 | >1.000 >30.000 | >1.000 >30.000 |
| RXF 944LX/6 | Y151JM | 203 | . | . | | . | . | >30.000 | >30.000 | >30.000 |
| Mean | | n=13 | | | 13.110 | | | 10.266 | 13.110 | 25.238 |

Abb. 88: Wirkprofil von Indirubin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethylamid) (82) im Colony-Forming-Assay.

Indirubin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid (86) hat eine im Mittel mäßig starke Hemmwirkung auf das Kolonienwachstum. Bemerkenswert ist jedoch sein Wirkspektrum. Die von vielen der anderen Indirubinderivaten gehemmte Mammakarzinomzelllinie MCF 7 erfährt kaum Beeinflussung. An der Zelllinie des großzelligen Lungenkarzinoms LXFL 529 dagegen beträgt der IC_{70} -Wert 0,4 μ M. Der Unterschied in der Wirksamkeit an zwei verschiedenen Melanomzelllinien ist auch hier beträchtlich, MEXF 989 wird 35 mal stärker gehemmt als MEXF 276. Jedoch hebt sich die Substanz in ihrer absoluten Wirkstärke an diesen beiden Zelllinien von allen anderen Substanzen, die im Rahmen dieser Arbeit getestet wurden, ab: der IC_{70} -Wert an MEXF 276 beträgt 0,7 μ M; der IC_{70} -Wert an MEXF 989 beträgt 0,02 μ M.

Die gute Wirksamkeit der beiden Derivate **82** und **86** ist möglicherweise durch ihre mittlere Lipophilie ($\log P_{ow} = 2,2$ bzw. 1,2; siehe Kapitel 4.9) erklärbar, die ihnen ein leichteres Eindringen in die Zellen ermöglicht. Allerdings erklärt dies nicht die Selektivität von Indirubin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid.

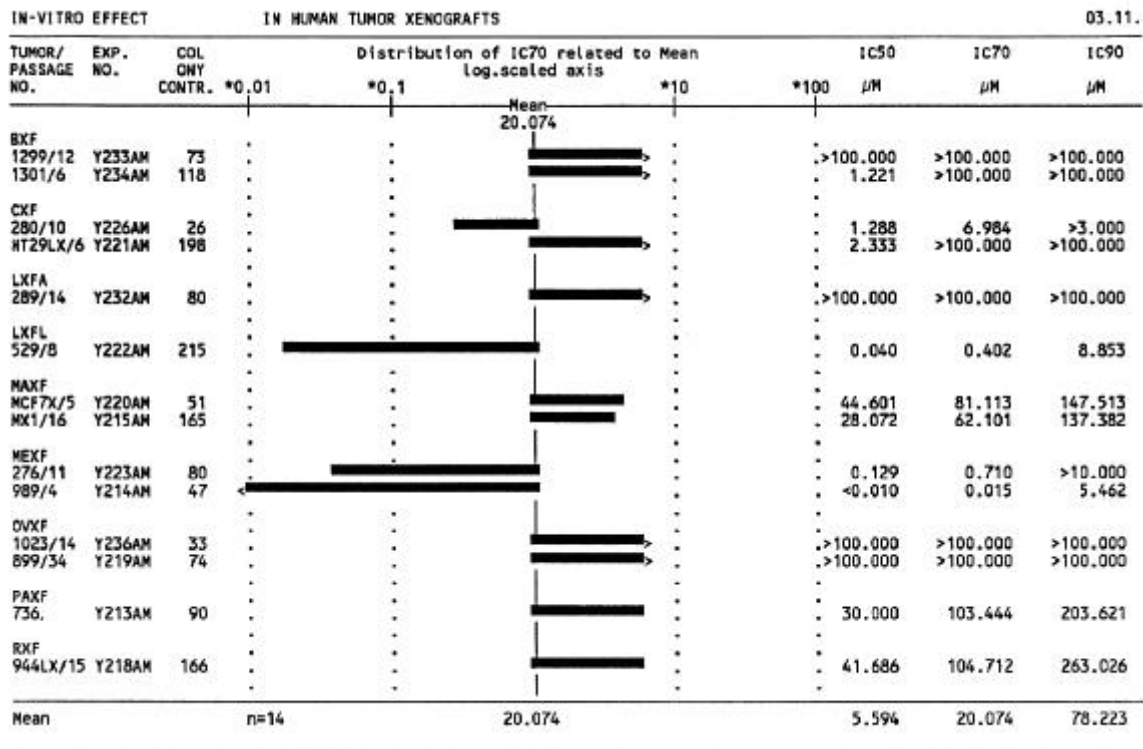


Abb. 89: Wirkprofil von Indirubin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid (86) im Colony-Forming-Assay.

Das Natriumsalz der **3'-Hydroxyiminoindirubin-5-sulfonsäure (92a)**, **1-Phenylindirubin** und **Indirubin-5-sulfonsäuremethyramid** sind mit durchschnittlichen IC₇₀-Werten von über 80 µM kaum wirksam. Bei den meisten Zelllinien liegt der IC₇₀-Wert über 100 µM.

Indigo ist mit einem durchschnittlichen IC₇₀-Wert von 56 µM kaum wirksam, auch sind bei den einzelnen Zelllinien keine bemerkenswerten Abweichungen vom Mittelwert zu verzeichnen. Lediglich die Zelllinie des Adenokarzinoms der Lunge LXFA 289 wird etwas stärker gehemmt (IC₇₀ = 12 µM). Die anderen Indigoderivate zeigen sich völlig unwirksam, bei einigen Zelllinien kommt es bei der höchsten Inkubationskonzentration (100 µM) sogar zu einem Wachstumsstimulus.

Tab. 68: Indigoderivate, Mittelwerte der IC₇₀-Werte über alle Zelllinien im Colony-Forming-Assay

| Substanz | IC ₇₀ -Mittelwert (µM) |
|---|-----------------------------------|
| Indigo (12) | 56 |
| Indigo-5,5',7,7'-tetrasulfonsäure (Tetrakaliumsalz) | kein Effekt |
| Indigo-5,5',7-trisulfonsäure (Trikaliumsalz) | kein Effekt |
| Indigocarmin | kein Effekt |

5-Iodisatin hat einen durchschnittlichen IC₇₀-Wert von 13 µM. Etwas besser als der Durchschnitt werden die beiden Lungentumoren LXFL 529 und LXFS 538 mit je 7 µM gehemmt. Die anderen **Isatinderivate** zeigen so gut wie keine Wirkung. Lediglich die Zelllinie des Pankreastumors PAXF 546 wird durch 5-Bromisatin (IC₇₀ = 5 µM) und 5-Chlorisatin (IC₇₀ = 21 µM) gehemmt.

Tab. 69: Isatinderivate, Mittelwerte der IC_{70} -Werte über alle Zelllinien im Colony-Forming-Assay

| Substanz | IC_{70} -Mittelwert (μM) |
|------------------------------------|---|
| 5-Iodisatin | 13 |
| 5-Bromisatin (30) | 70 |
| Isatin (10) | 89 |
| 1-Phenylisatin (26) | 99 |
| 5-Chlorisatin (32) | 108 |
| 5-Fluorisatin (61) | 160 |
| 5-Methylisatin (63) | kein Effekt |
| Isatin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) | kein Effekt |
| 5-Nitroisatin (64) | kein Effekt |
| 1-Methylisatin (60) | kein Effekt |

3-Indoxylacetat und **5-Brom-3-indoxylacetat** sind durchschnittlich kaum wirksam. 3-Indoxylacetat bewirkt allerdings bei der Pankreastumor-Zelllinie PAXF 546 eine verstärkte Wachstumshemmung ($IC_{70} = 6 \mu\text{M}$). 5-Brom-3-indoxylacetat zeigt kein ausgeprägtes Wirkspektrum.

Tab. 70: Derivate des Indoxylacetats (**19**): Mittelwerte der IC_{70} -Werte über alle Zelllinien im Colony-Forming-Assay

| Substanz | IC_{70} -Mittelwert (μM) |
|--------------------------------------|---|
| 3-Indoxylacetat (19) | 34 |
| 5-Brom-3-indoxylacetat (66) | 67 |

2,2'-Bisindol ist mit $82 \mu\text{M}$ im Mittel kaum wirksam, zeigt jedoch eine starke Wirksamkeit an MCF 7X-Zellen ($IC_{70} = 3 \mu\text{M}$), die der absoluten Unwirksamkeit ($IC_{70} > 100 \mu\text{M}$) an den restlichen Zelllinien gegenüber steht.

| IN-VITRO EFFECT | | | IN HUMAN TUMOR XENOGRAFTS | | | | 12.05.97 11:22:54 | | |
|---------------------------|------------------|----------------------|---|------|-----|------|----------------------|----------------------|----------------------|
| TUMOR/ PASSAGE NO. | EXP. NO. | COL ONY CONTR. | Distribution of IC70 related to Mean log.scaled axis | | | | IC50 | IC70 | IC90 |
| | | | *0.01 | *0.1 | *10 | *100 | ug/ml | ug/ml | ug/ml |
| Mean 81.598 | | | | | | | | | |
| BXF 1299/22 1301 | X0680M * (2) | 114 190 | . | . | . | . | >100.000 >100.000 | >100.000 >100.000 | >100.000 >100.000 |
| CXF 280/22 HT29X | X078CM * (2) | 75 83 | . | . | . | . | <1.000 >100.000 | >100.000 >100.000 | >100.000 >100.000 |
| LXFA 289/16 526/5 | X082EM X127CM | 27 265 | . | . | . | . | >100.000 >100.000 | >100.000 >100.000 | >100.000 >100.000 |
| LXFL 529/15 | X060CM | 165 | . | . | . | . | >100.000 | >100.000 | >100.000 |
| LXFS 650/7 | X095CM | 40 | . | . | . | . | >100.000 | >100.000 | >100.000 |
| MAXF MX1 MCF7X/25 | * (2) X069CM | 200 296 | . | . | . | . | >100.000 <1.000 | >100.000 2.571 | >100.000 8.376 |
| MEXF 514/9 989/20 | X128CM X074CM | 45 295 | . | . | . | . | >100.000 >100.000 | >100.000 >100.000 | >100.000 >100.000 |
| OVXF 899/30 1353/14 | X070CM * (2) | 121 32 | . | . | . | . | >100.000 >100.000 | >100.000 >100.000 | >100.000 >100.000 |
| PAXF 546 736/15 | * (2) X073CM | 165 98 | . | . | . | . | >100.000 >100.000 | >100.000 >100.000 | >100.000 >100.000 |
| RXF 1220/6 944LX | X075CM * (2) | 149 74 | . | . | . | . | >100.000 >100.000 | >100.000 >100.000 | >100.000 >100.000 |
| Mean | | n=18 | | | | | ?????????? | 81.598 | 87.130 |

Abb. 90: Wirkprofil von 2,2'-Bisindol (46) im Colony-Forming-Assay.

3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol hat einen durchschnittlichen IC_{70} -Wert von 15 μM und weist ein ausgeprägtes Wirkprofil auf, mit starker Wachstumshemmung auf die colorectale Zelllinie HT 29X ($IC_{70} = 3 \mu\text{M}$), die beiden Brustkrebszelllinien MX 1 und MCF 7X (je etwa 4 μM) und das Melanom MEXF 514 (3 μM). Keine Wirksamkeit zeigt 3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol gegenüber dem Lungenadenokarzinom LXFA 289, bei dem der IC_{70} -Wert über 100 μM liegt. Bemerkenswert ist der große Unterschied zwischen den beiden Melanomzelllinien. Der sehr guten Wirksamkeit an MEXF 514 (3 μM) steht die geringe Wirksamkeit an MEXF 989 ($IC_{70} = 59 \mu\text{M}$) gegenüber. Ein umgekehrter Effekt wird bei Isoindigo, 5'-Bromindirubin, 5,5'-Dibromindirubin, 5'-Bromindirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (69a), Indirubin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethylamid) (82) und Indirubin-5-sulfonsäure-bis(2-hydroxyethyl)-amid beobachtet.

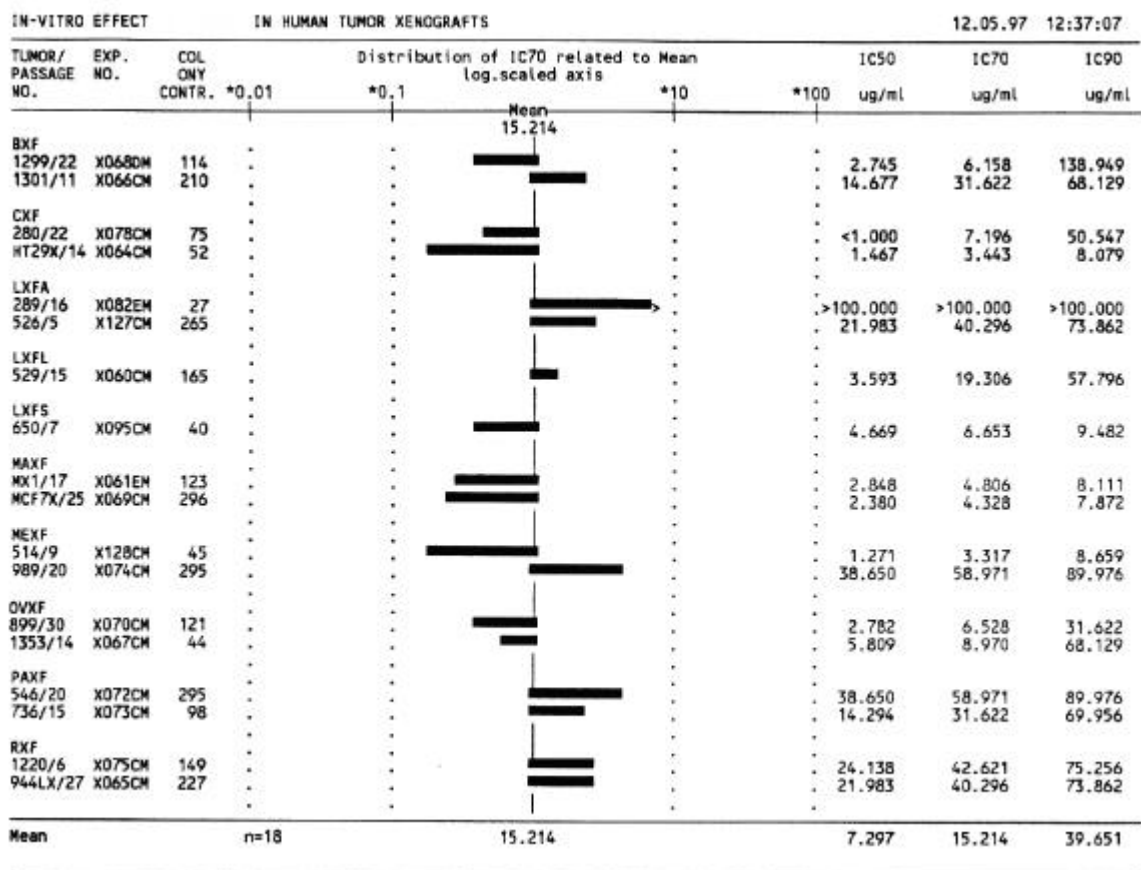


Abb. 91: Wirkprofil von 3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol (**48**) im Colony-Forming-Assay.

Die beiden Edukte der 2,2'-Bisindolderivate sind unwirksam.

Tab. 71: 2,2'-Bisindole und jeweiliges Edukt, Mittelwerte der IC₇₀-Werte über alle Zelllinien im Colony-Forming-Assay

| Substanz | Mittelwert (µM) |
|---|-----------------|
| <i>N,N</i> -Bis(2-benzoylphenyl)-oxamid | kein Effekt |
| 3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol (48) | 15 |
| <i>N,N</i> -Di- <i>o</i> -tolylloxamid | kein Effekt |
| 2,2'-Bisindol (46) | 82 |

Bei 2,2'-Bisindol, Indirubin und bei allen in 5-Position substituierten Indirubinderivaten, die keine Sulfonsäurederivate oder Oxime sind, zeigt die Brusttumor-Zelllinie MCF 7X eine bis zu 50-fache erhöhte Sensitivität im Vergleich zum Durchschnitt. Bei 3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol ist diese Zelllinie eine der empfindlichsten. In Metabolismusstudien mit den kanzerogenen polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen Benzo[*c*]phenanthren (Einolf et al., 1996) und Dibenzo[*a,l*]pyren (Ralston et al., 1995) konnte belegt werden, daß MCF 7-Zellen Xenobiotika oxidativ metabolisieren können. Rodgers und Grant (1998) zeigten, daß in MCF 7-Zellen Isoenzyme der Cytochrom-P450-1A-Unterfamilie exprimiert werden. Auch die Metabolisierung der Indirubinderivate erscheint notwendig, um die sehr schlecht bioverfügbaren Substanzen polarer zu machen. Lügen in den MCF 7-Zellen entsprechende Konzentrationen an Cytochrom-P450 oder anderer, für den Metabolismus von Indirubinderivaten spe-

zifischer Isoenzyme vor, böte sich ein interessanter Erklärungsansatz zur beobachteten Selektivität der Indirubinderivate.

Über die Ausstattung der anderen in dieser Arbeit erwähnten Xenograftzelllinien mit oxidierenden Enzymen gibt es nur zum colorectalen Tumor HT 29 Untersuchungen, die darauf hindeuten, daß auch diese Zellen zum oxidativen Metabolismus fähig sind (Burczynski et al., 1999), wobei ein Teil des oxidierenden Systems in der Zellmembran lokalisiert ist (Giulivi und Cadenas, 1998).

4.8.2 Beteiligung der Interkalation am Wirkmechanismus

Eine Beteiligung der Interkalation am Wirkmechanismus der Indirubinderivate scheint möglich, denn im Colony-Forming-Assay (**Tab. 67**) zeigt Indirubin-3'-oxim eine der besten Wirksamkeiten ($IC_{70} = 14 \mu\text{M}$), und 5-Fluorindirubin ($IC_{70} = 20 \mu\text{M}$) hat im Vergleich zu Indirubin und den nur in 5-Position substituieren Derivaten eine der besseren Wirksamkeiten. In beiden Fällen liegt der durchschnittliche IC_{70} -Wert in der gleichen Größenordnung oder etwas höher, verglichen mit den ED_{50} -Werten der Ethidiumbromid-Verdrängung. Die Verbindungen mit den kleinsten ED_{50} -Werten Indirubin-3'-oxim und 5-Fluorindirubin zeigen außerdem auch im SRB-Assay (**Tab. 73**) IC_{50} -Werte, die in der gleichen Größenordnung liegen.

Beim Wirkmechanismus von Isoindigo spielt die Interkalation nach den hier und in Kapitel 4.6 gefundenen Ergebnissen keine Rolle. Seiner sehr guten Wirksamkeit im SRB-Assay (**Tab. 73**) und im Colony-Forming-Assay (**Tab. 67**) steht im Ethidiumbromidverdrängungsassay ein wesentlich höherer ED_{50} -Wert gegenüber.

4.8.3 Beteiligung der Hemmung von CDK1/Cyclin B am Wirkmechanismus

Läßt man die ionischen Verbindungen, von denen kaum eine Wachstumshemmung zu erwarten gewesen war, bei der Betrachtung außen vor, so ist der stärkste Inhibitor von CDK1/Cyclin B (siehe **Tab. 64**) 5-Iodindirubin-3'-oxim, gefolgt von Indirubin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid, Indirubin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid, Indirubin-5-sulfonamid und Indirubin-3'-oxim. Drei dieser Substanzen sind auch im Colony-Forming-Assay (siehe **Tab. 67**) unter den wirksamsten Derivaten. 1-Phenylindirubin, das keine CDK1-Hemmung bewirkt, zeigt auch im Colony-Forming-Assay (siehe **Tab. 67**) kaum eine Wirkung. Diese Korrelation ist ein starkes Indiz dafür, daß einer der Hauptwirkmechanismen der Indirubinderivate in der Hemmung cyclinabhängiger Kinasen besteht.

Für Isoindigo spielt die Hemmung des Enzymkomplexes sehr wahrscheinlich keine Rolle, da es trotz seines hohen IC_{50} -Wertes von $80 \mu\text{M}$ am Enzymkomplex CDK1/Cyclin B im Colony-Forming-Assay die wirksamste Substanz ist.

4.9 Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient, Lipophilie-Wirkungs-Abhängigkeit

Der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (P_{OW}) ist der Quotient aus der Konzentration in Octanol und der Konzentration in wäßriger Phase, nachdem sich zwischen beiden ein Gleichgewicht einstellen konnte. In **Tab. 72** sind die dekadischen Logarithmen, $\log P_{OW}$, der in dieser Arbeit behandelten indigoiden Substanzen angegeben.

Konzentrierte Lösungen in *n*-Octanol werden mit dem gleichen Volumen einer Pufferlösung niedriger Salzkonzentration mit einem pH-Wert von 7,4 ausgeschüttelt. Von den in *n*-Octanol sehr schlecht löslichen Substanzen Indirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (**29b**) und 5'-Bromindirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (**69a**) werden gesättigte Lösungen in der Pufferlösung hergestellt und diese mit dem gleichen Volumen *n*-Octanol ausgeschüttelt. Nach der Phasentrennung wird die wäßrige Phase entweder direkt der Gehaltsbestimmung zugeführt oder bei zu konzentrierten Lösungen mit Methanol geeignet verdünnt. Die Octanollösung wird vor dem Vermessen 1 : 10 mit Methanol verdünnt und bei zu konzentrierten Lösungen noch geeignet weiter verdünnt. Die Konzentrationsbestimmungen erfolgen mittels RP-HPLC und UV-Detektion. Als Fließmittel dienen Methanol-Wasser- und Acetonitril-Wasser-Gemische. Die Quantifizierung erfolgt über die Flächen der Peaks bei isokratischer Elution. Die Abschätzung der unteren Nachweisgrenzen erfolgt über die Peakhöhen.

Isoindigo, 5-Bromindirubin, 5-Methylindirubin, 5-Chlorindirubin, Indirubin-3'-oxim, und 5-Iodindirubin-3'-oxim zeigen $\log P_{OW}$ -Werte im Bereich von 4 bis 5 (**Tab. 72**) und müssen daher als sehr lipophil eingestuft werden. Indirubin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid ($\log P_{OW} = 2,2$) und Indirubin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid ($\log P_{OW} = 1,2$) zeigen eine etwa 100- bzw. 1000-fach schwächere Lipophilie. Die 2-Hydroxyethyl-Gruppen im Molekül verbessern entscheidend die Wasserlöslichkeit. Wie zu erwarten, zeigen die drei ionischen Verbindungen, das Natriumsalz der Indirubin-5-sulfonsäure, das Natriumsalz der 5'-Bromindirubin-5-sulfonsäure und das Natriumsalz der 3'-Hydroxyiminoindirubin-5-sulfonsäure einen negativen $\log P_{OW}$, das heißt sie sind in der wäßrigen Phase besser löslich als in der organischen. Das Natriumsalz der Indirubin-5-sulfonsäure mit einem $\log P_{OW}$ von -1,8 zum Beispiel löst sich etwa 60 mal besser in der Pufferphase als in *n*-Octanol.

Problematisch für die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten ist die schlechte absolute Löslichkeit vieler Vertreter der Substanzklasse sowohl im wäßrigen als auch im lipophilen System. So gelang es bei fast der Hälfte der Verbindungen nicht, genügend Substanz in *n*-Octanol in Lösung zu bringen, um

den geringen Teil, der beim Ausschütteln in die wäßrige Phase übergeht dort noch nachweisen zu können. Für zehn Derivate können deshalb nur untere Grenzen für den $\log P_{OW}$ angegeben werden. Diese untere Grenze besitzt für die noch einigermaßen gut löslichen Derivate 5'-Bromindirubin und 5-Iodindirubin eine gewisse Aussagekraft, da die Angabe in erster Linie von der Nachweisgrenze in der wäßrigen Phase abhängt. Dagegen ist zum Beispiel bei Indirubin-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid (77), das die geringste Löslichkeit hat, die Angabe "größer als 1,8" nur noch Ausdruck der Tatsache, daß sich in beiden Phasen die Löslichkeit um die Nachweisgrenze bewegt und gibt keine Information mehr über das Verteilungsverhalten (Tab. 72).

Tab. 72: Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten

| Substanz | c_{Oct} (mM) ¹⁾ | $\log P_{OW}$ |
|--|------------------------------|-----------------------|
| Indirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (29b) | 0,008 | - 1,8 |
| 5'-Bromindirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (69a) | 0,02 | - 1,4 |
| 3'-Hydroxyiminoindirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (92a) | 0,48 | - 0,8 |
| Indirubin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxy-ethyl)-amid (86) | 0,15 | 1,2 |
| Indirubin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid (82) | 0,006 | 2,2 |
| Isoindigo (13) | 0,99 | 3,8 |
| 5-Bromindirubin (31) | 0,82 | 4,1 |
| 5-Methylindirubin (36) | 1,6 | 4,7 |
| 5-Chlorindirubin (33) | 3,2 | 4,9 |
| 5-Iodindirubin-3'-oxim (91) | 3,8 | 4,9 |
| Indirubin-3'-oxim (87) | 13 | 5,3 |
| 5'-Bromindirubin (67) | 0,87 | (> 4,8) ²⁾ |
| 5-Iodindirubin (90) | 0,91 | (> 4,5) ²⁾ |
| 5,5'-Dibromindirubin (68) | 0,17 | (> 4,2) ²⁾ |
| 5-Fluorindirubin (62) | 0,19 | (> 4,1) ²⁾ |
| Indirubin (11) | 0,14 | (> 3,6) ²⁾ |
| 1-Methylindirubin (25) | 0,12 | (> 3,1) ²⁾ |
| 5-Nitroindirubin (65) | 0,02 | (> 2,8) ²⁾ |
| Indirubin-5-sulfonsäuremethylamid (75) | 0,01 | (> 2,7) ²⁾ |
| Indigo (12) | 0,06 | (> 2,6) ²⁾ |
| Indirubin-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid (77) | 0,003 | (> 1,8) ²⁾ |

¹⁾ Konzentration c_{Oct} in der *n*-Octanol-Phase nach dem Ausschütteln; ²⁾ in der wäßrigen Phase war keine Substanz nachweisbar. Die untere Grenze für $\log P_{OW}$ wurde durch Einsetzen der Nachweisgrenze berechnet.

Wie bereits Hansch 1969 in einem Übersichtsartikel zusammengefaßt hat, korrelieren zahlreiche biologische Wirkungen mit der Lipophilie der untersuchten Stoffe, wie zum Beispiel die Wachstumshemmung verschiedener Bakterienstämme durch Phenole oder andere Substanzklassen oder die Anreicherung von Phenylboronsäuren im Gehirn von Mäusen. Dabei wird der dekadische Logarithmus $\log(1/C)$ gegen $\log P_{OW}$ aufgetragen. C ist die Konzentration eines Stoffes, bei der ein bestimmter biologischer Effekt eintritt. Die Lipophilie-Wirkungs-Abhängigkeit konnte in den meisten Fällen mit hohen Korrelationskoeffizienten parabolisch angenähert werden. Ein Maximum der Wirkung wurde

häufig bei Lipophiliewerten ($\log P_{OW}$) um 2 gefunden, vereinzelt auch bei höheren Werten (Hansch, 1969).

In **Abb. 92** sind die Kehrwerte der mittleren IC_{70} -Werte der Indirubinderivate aus den Colony-Forming-Assays gegen die Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten aufgetragen. Als Ausgleichsfunktion wird eine Parabel gewählt. Der r^2 -Wert ist akzeptabel (0,745) und die Wahrscheinlichkeit für das gewählte Modell ist hoch ($p = 0,008$). Das Maximum der Kurve befindet sich in einem $\log P_{OW}$ -Bereich von etwa 3 bis 4. Dieser Bereich ist somit der optimale Lipophiliebereich für potentiell stärker wachstumshemmende Indirubinderivate, ungeachtet anderer Eigenschaften, wie Interkalationsfähigkeit oder Inhibition von CDKs. Isoindigo wurde aufgrund seiner abweichenden Grundstruktur nicht in die Korrelation mit einbezogen. Es befindet sich aber interessanterweise mit seinem $\log P_{OW}$ von 3,8 innerhalb des Optimalbereichs und hat gleichzeitig den stärksten wachstumshemmenden Effekt im Colony-Forming-Assay.

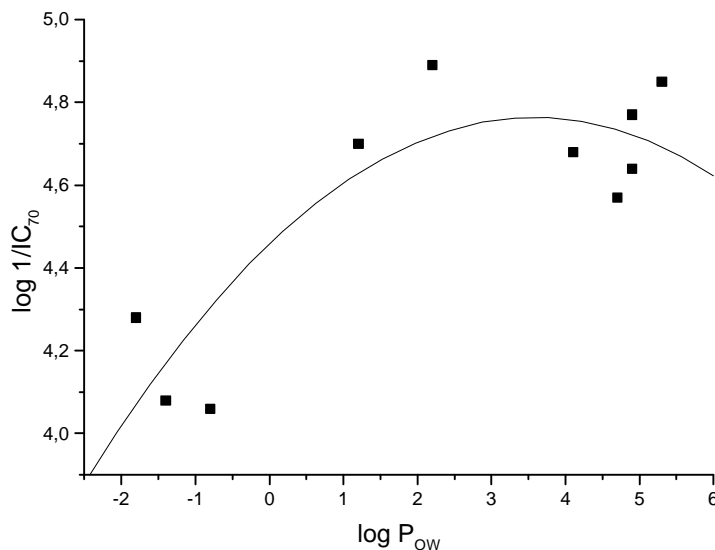


Abb. 92: Quantitative Lipophilie-Wirkungsbeziehung der Indirubinderivate. Die Kehrwerte der mittleren IC_{70} -Werte aus den Colony-Forming-Assays sind gegen den Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten aufgetragen (doppelt-logarithmische Auftragung).

Parabelgleichung: $\log IC_{70} = -a (\log P_{OW})^2 + b \log P_{OW} + c$
 $a = 0,024 \pm 0,013$; $b = 0,17 \pm 0,05$; $c = 4,46 \pm 0,09$
 $r^2 = 0,745$; $SD = 0,174$; $N = 10$; $p = 0,008$

4.10 Luciferase-Assay

Die signifikant höhere Sensitivität der MCF 7-Xenografts auf die in Kapitel 4.8.1 erwähnten Bisindol-derivate führte zu der Vermutung, daß die Substanzen möglicherweise mit den Steroidhormonrezeptoren der Zellen wechselwirken könnten. Die Colony-Forming-Assays wurden im Gegenwart von fötalem Kälberserum (FKS) durchgeführt. In FKS befindet sich eine Reihe von estrogenen Substanzen.

Daher sollte es nur bei extrem estrogenem oder antiestrogenem Potential der Indirubinderivate zu einem beobachtbaren Effekt kommen. Mit einer transfizierten MCF 7-Zelllinie wurde mit dem Luciferase-Assay dennoch ein Versuch unternommen, den potentiellen Effekt auf Hormonrezeptoren mechanistisch genauer zu untersuchen.

Die humane Mammakarzinomzelllinie MCF 7-luc wurde mit dem Reporter-genplasmid *pVIT-A2-tk-Luc* stabil transfiziert, das die Expression der Luciferase, eines Enzyms des amerikanischen Glühwürmchens (*photinus pyralis*) erlaubt. Die Expression der Luciferase wird durch einen estrogenkontrollierten Promotor kontrolliert (*estrogen responsive element* oder *estrogen regulatory element*, ERE). Der Reporter-genpromotor stellt die regulatorische Sequenz des Vitellogenin A2-Gens des afrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) dar und ist mit dem starken Promotor eines viralen Gens, dem Thymidinkinasegen des *Herpes simplex*-Virus gekoppelt. Der Wildtyp-Vitellogenin A2-Promotor besitzt vier EREs (Pons et al. 1990). Eine Behandlung der Zellen mit einer estrogenen Substanz bewirkt die Expression der Luciferase, die über eine spezifische Enzymreaktion Photonen im sichtbaren Bereich erzeugt. Diese Photonen werden mittels Luminometer nachgewiesen; dabei ist die Lichtintensität proportional zur Menge der exprimierten Luciferase. Aufgrund der Luciferaseaktivität lassen sich Rückschlüsse auf das estrogene oder antiestrogene Potential der Substanz schließen. Dieses Testsystem wurde in unserer Gruppe etabliert (Mußler, 1999) und wird nach der Methode von Promega (1996) durchgeführt.

Die Substanzen Indirubin, 5-Bromindirubin, 5-Methylindirubin und das Natriumsalz der Indirubin-5-sulfonsäure bewirkten bis zu einer Konzentration von 30 µM keine verstärkte Chemolumineszenz im Vergleich zur Kontrolle (Böhm und Seng, persönliche Mitteilung, 1998). Sie haben nach diesem Assay zu urteilen also keine estrogene Aktivität. Ein weiterer Erklärungsansatz könnte eine potentielle antiestrogene Wirkung sein. Dies könnte zum Beispiel im Luciferase-Assay über die Bestimmung der Reporter-geninduktionshemmung des physiologischen Liganden (Estradiol) untersucht werden.

4.11 Sulforhodamin B-Assay

Der Sulforhodamin B-Assay (SRB-Assays) wurde von Skehan et al. (1990) entwickelt und beruht auf der Anfärbung von Lebendprotein mit dem Xanthen-Farbstoff Sulforhodamin B. Nach dem Fixieren der Zellen am Boden der Kulturgefäße werden sie mit Farbstofflösung versetzt. Der Farbstoff bindet an das Protein der Zellen, und die aufgenommene Farbstoffmenge ist proportional zur Menge des Proteins. Durch Zugabe von Tris/HCl-Puffer solubilisiert der Farbstoff wieder, und die Extinktionswerte der Farbstofflösungen können im Absorptionsmaximum des SRB bei 564 nm im UV/vis-Spektrometer gegen einen Blindwert bestimmt werden. Sie sind der Menge an Lebendprotein und somit der Zellzahl proportional.

Die Zytotoxizitätstests wurden an den Zelllinien LXFL 529L und MFC-7 durchgeführt.

Die Zelllinie LXFL 529 entstammt dem großzelligen Lungenkarzinom einer 34-jährigen Patientin. Der medizinische Befund zeigte einen regionalen Lymphknotenbefall aber keine Metastasierung. Die Zellen wurden dem nicht vorbehandelten Primärtumor entnommen und werden seit April 1984 in Nacktmäusen passagiert (Fiebig und Berger, 1992). Die Zelllinie ist gut charakterisiert, auch im Hinblick auf ihre Empfindlichkeit gegenüber bekannten Chemotherapeutika (Fiebig und Berger, 1992) und wird deshalb häufig für eine erste Einschätzung neuer Substanzen eingesetzt.

Die als MCF 7 bezeichnete humane Zelllinie wurde 1973 aus dem pleuralen Erguß einer Patientin mit metastasierendem Mammakarzinom gewonnen (Soule et al., 1973). Sie ist die am Besten charakterisierte steroidhormonrezeptorpositive Mammakarzinomzelllinie, dabei relativ gut differenziert und stellt ein etabliertes *in vitro*-Testsystem dar (Gottardis und Jordan, 1988; Levenson und Jordan, 1997). Sie weist in den Colony-Forming-Assays (Kapitel 4.8.1) eine herausragende Sensitivität für Indirubinderivate auf. Um dieses Ergebnis mit einem anderen Endpunkt abzusichern und um die Übertragbarkeit auf das Testsystem SRB-Assay abschätzen zu können, wurde begonnen, Vertreter der Stoffklasse auch in diesem Modell zu untersuchen (Schätzle, 1999). In **Tab. 73** sind IC₅₀-Werte an den beiden Zelllinien einander gegenüber gestellt.

Tab. 73: Indirubinderivate und Isoindigo (**13**), Sulforhodamin B-Assay an LXFL 529L und MCF 7, IC₅₀-Wert in µM

| Substanz | MCF 7 | LXFL 529L |
|---|-------------------------|--------------------------|
| Isoindigo (13) | nb | 1 |
| Indirubin-3'-oxim (87) | 3,3 ± 0,4 ¹⁾ | 3,0 ± 0,5 ¹⁾ |
| 5-Iodindirubin (90) | 7 ²⁾ | 5 |
| 5-Bromindirubin (31) | nb | 5 |
| 1-Phenylindirubin (28) | 7,4 ± 0,5 ¹⁾ | 5,4 ± 2,2 ¹⁾ |
| 5-Chlorindirubin (33) | nb | 7 |
| 5-Fluorindirubin (62) | nb | 7 |
| 5'-Bromindirubin (67) | nb | 8 |
| 5-Methylindirubin (36) | nb | 10 |
| 5-Iodindirubin-3'-oxim (91) | 6,6 ± 0,7 ¹⁾ | 13,2 ± 3,4 ¹⁾ |
| Indirubin (11) | 4 ²⁾ | 11 |
| Indirubin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid (86) | 7,5 ± 1,3 ¹⁾ | 25,6 ± 1,9 ¹⁾ |
| 5,5'-Dibromindirubin (68) | nb | > 30 |
| 5-Nitroindirubin (65) | nb | 40 |
| Natriumsalz der 5'-Bromindirubin-5-sulfonsäure (69a) | nb | > 50 |
| Natriumsalz der Indirubin-5-sulfonsäure (29b) | nb | > 100 |
| 1-Methylindirubin (25) | fällt aus | fällt aus |
| Natriumsalz der 3'-Hydroxyiminoindirubin-5-sulfonsäure (92a) | >100 ¹⁾ | >100 ¹⁾ |
| Indirubin-5-sulfonsäuremethylamid (75) | 1,8 ± 0,1 ¹⁾ | fällt aus ¹⁾ |
| Indirubin-5-sulfonsäuredimethylamid (78) | >100 ¹⁾ | >100 ¹⁾ |

¹⁾Schätzle (1999); ²⁾Niederberger, persönliche Mitteilung (1996); nb = nicht bestimmt

Isoindigo erwies sich im SRB-Assay an der Zelllinie LXFL 529L als die wirksamste Substanz, wie auch in den Colony-Forming-Assays (Kapitel 4.8.1) beobachtet. 5-Iodindirubin-3'-oxim ist an beiden Zelllinien etwa zwei bis drei mal so wirksam wie Indirubin-3'-oxim. Ein Effekt, der an der MCF 7-Zelllinie auch im Colony-Forming-Assay beobachtet wird.

Bei einigen Indirubinderivaten deutet sich an, daß die Zelllinie MCF 7 sensibler reagiert. Bei 5-Iodindirubin und 1-Phenylindirubin ist dies nicht der Fall. Es muß also mit weiteren Versuchen abgeklärt werden, ob der SRB-Assay den Sensitivitätsunterschied, der im Colony-Forming-Assay an den beiden Zelllinien LXFL 529 und MCF 7 beobachtet wird, reproduzieren kann.

Die Sulfonsäurederivate, deren starke Hemmwirkung auf den Enzymkomplex CDK1/Cyclin B (Kapitel 4.7) zunächst auf stärker wachstumshemmende Wirkung hoffen ließ, erwiesen sich sowohl an LXFL 529L als auch an MCF 7 (**Tab. 73**) als inaktiv. Wie bereit in Kapitel 4.8.1 erläutert, resultiert dieses Verhalten unter anderem daraus, daß ionische Substanzen ohne aktiven Transportmechanismus nur schwer in die Zelle bzw. in den Zellkern eindringen können, um dort ihre potentielle Wirkung entfalten zu können.

Eine Untersuchung der Isatinderivate an der LXFL 529L-Zelllinie zeigte eine nur schwache oder keine Zytotoxizität (**Tab. 74**).

Tab. 74: Isatinderivate, Sulforhodamin B-Assay an LXFL 529L, IC₅₀-Wert in µM

| Substanz | LXFL 529L |
|---|-----------|
| 5-Iodisatin | 33 |
| 1-Methylisatin (60) | 33 |
| 5-Bromisatin (30) | 65 |
| 5-Chlorisatin (32) | 77 |
| Isatin | > 100 |
| 5-Fluorisatin (61) | > 100 |
| 5-Methylisatin (63) | > 100 |
| 5-Nitroisatin (64) | > 100 |
| Isatin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid (81) | > 100 |

4.12 Erste *in vivo*-Versuche an der Nacktmaus

Um einen ersten Eindruck davon zu bekommen, ob sich die *in vitro* gefundenen Werte in der Wirksamkeit am Organismus widerspiegeln, wurden erste orientierende Tierversuche an thymusaplastischen Nacktmäusen durchgeführt. Zusätzlich ermöglicht die Durchführung der Versuche an der Maus eine erste Abschätzung der Toxizität der Substanz, denn die Toxizität an der Maus (LD₁₀-Wert) korreliert gut mit der maximal tolerierbaren Dosis beim Menschen (Freireich et al., 1966). Die Versuche wurden von Dr. Thomas Roth bei Oncotest GmbH, Freiburg durchgeführt.

Im *in vivo*-Versuch werden die Substanzen **Indirubin**, **5-Chlorindirubin** und **5-Methylindirubin** am großzelligen Lungenkarzinom LXFL 529 untersucht. Es wird subkutan in immundefiziente Nacktmäuse implantiert. Die Substanzgabe erfolgt intraperitoneal (i.p.) als Suspension in einem Gemisch aus $\frac{1}{3}$ DMSO und $\frac{2}{3}$ Wasser in verschiedenen Dosierungen (100 - 300 mg / kg Tag, siehe **Tab. 75**). Der Tumor wird 11 Tage vor der ersten Substanzgabe (= Tag 1) implantiert. Die behandelten Gruppen bestehen jeweils aus drei Tieren, die Kontrolle besteht aus fünf Tieren. Bis zum Tag fünf werden alle drei Substanzen gegeben. Ab Tag sechs wird 5-Chlorindirubin abgesetzt und ab Tag zehn wird nur noch 5-Methylindirubin gegeben. Rein optisch ist zu erkennen, daß der größte Teil der verabreichten Substanz im Falle des Indirubins und in noch stärkerem Maße im Falle des 5-Chlorindirubins (**33**) im Peritonealraum der Mäuse verbleibt. Lediglich 5-Methylindirubin wird merklich aus dem Peritonealraum transportiert, so daß nur hier eine weitere Substanzgabe sinnvoll erschien.

Alle drei Substanzen bewirken eine Hemmung des Tumorwachstums. Die jeweilige zeitliche Verzögerung, bis zum Erreichen von 200 % des Ausgangsvolumens des Tumors (200 %-Wachstumsverzögerung, 200 % *growth delay*) ist in **Tab. 75** aufgelistet. Indirubin und 5-Chlorindirubin bewegen sich dabei in der gleichen Größenordnung. Die mit 5-Methylindirubin behandelte Gruppe setzt sich etwa ab Tag zehn mit einem Tumorzuwachs von unter 200 % von den anderen vier Gruppen ab (**Abb. 93**). Eine Vergrößerung des Tumors auf über 200 % der Ausgangsgröße wird darauf hin in der mit 5-Methylindirubin behandelten Gruppe nicht beobachtet, sondern es kommt in etwa von Tag zehn an zu einem Stillstand des Tumorwachstums. Bei den mit Indirubin und 5-Chlorindirubin behandelten Mäusen kommt es zu einem Weiterwachsen des Tumors, wie es in gleichem Maße etwa zwölf Tage vorher bei der Kontrolle beobachtet worden ist.

Tab. 75: Wachstumsverzögerung des Tumors LXFL 529 in der thymusaplastischen Nacktmaus durch Idirubin, 5-Chlorindirubin (33) und 5-Methylindirubin (36) bei unterschiedlichen Dosierungen

| Dosierung | 200 %- Wachstumsverzögerung (Tage) | 400 %- Wachstumsverzögerung (Tage) |
|--|------------------------------------|------------------------------------|
| Indirubin 200 mg / kg Tag, 1-5, 8-9 | 8 | 17 |
| Indirubin 100 mg / kg Tag, 1-5, 8-9 | 4 | 17 |
| 5-Chlorindirubin (33) 300 mg / kg Tag, 1-5, 8-9 | 6 | 21 |
| 5-Chlorindirubin (33) 100 mg / kg Tag, 1-5, 8-9 | 7 | 19 |
| 5-Methylindirubin (36) 100 mg / kg Tag, 1-5, 8-12, 15, 17, 20, 22, 24, 27. | 6 | 400 % wurden nicht erreicht |

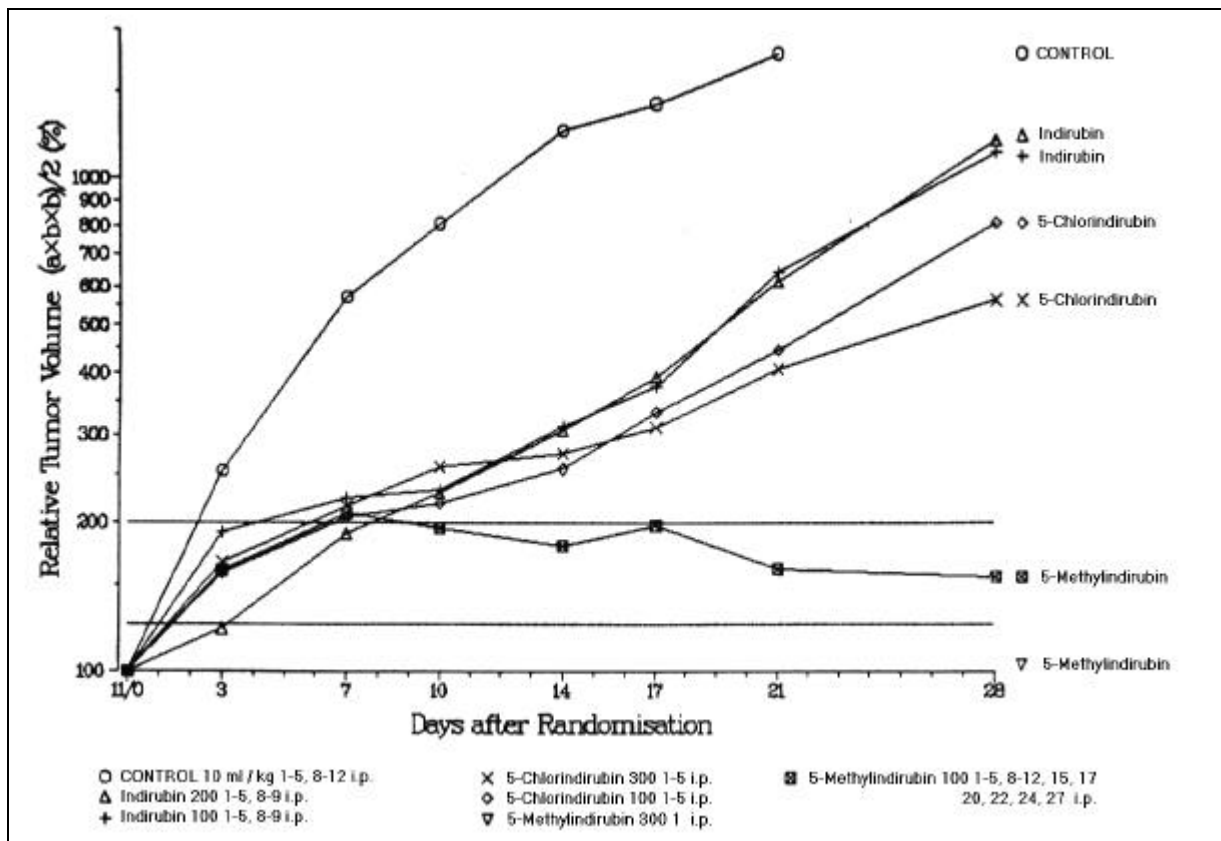


Abb. 93: Relatives Tumolvolumen (*Relative Tumor Volume*) aufgetragen gegen die Zeit (*Days after Randomisation*).

Die Ergebnisse einer solchen *in vivo*-Untersuchung sind nur aussagekräftig, wenn das Körpergewicht der Versuchstiere während des Versuchs nicht zu stark abnimmt. Ein heftiger Gewichtsverlust würde einen schlechten allgemeinen Gesundheitszustand widerspiegeln, und einer Verringerung des Tumorumens könnte dann nicht mehr viel Bedeutung beigemessen werden. Dies ist hier nicht der Fall (**Abb. 94**). Lediglich die beiden mit Idirubin behandelten Gruppe zeigen ein leichtes Absinken des Körpergewichts.

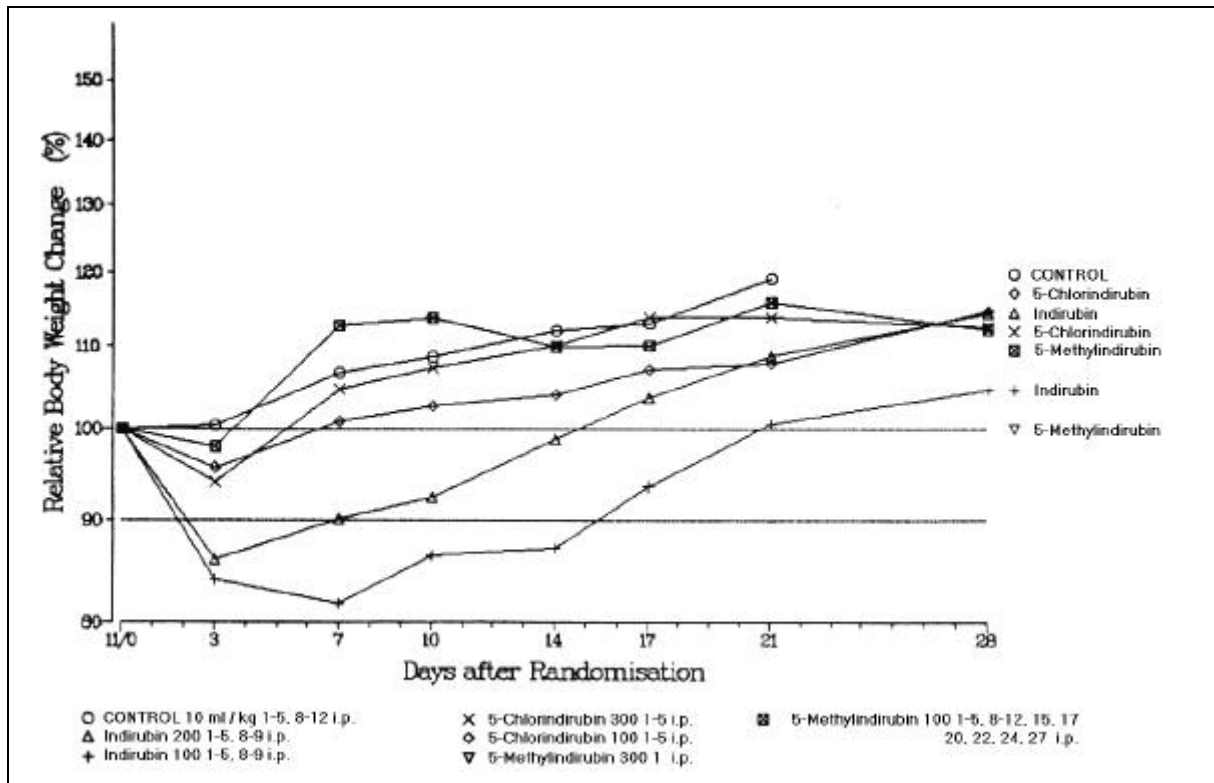


Abb. 94: Veränderung des Gesamtkörpergewichts der Versuchstiere (*Relative Body Weight Change*) während der Substanzgabe aufgetragen gegen die Zeit (*Days after Randomisation*).

Aus der Tatsache, daß 5-Methylindirubin als einzige der drei Substanzen aus dem Injektionsbereich transportiert wird, wird deutlich, daß es besser bioverfügbar ist als Indirubin und 5-Chlorindirubin. Dies steht sicherlich mit der Methylgruppe in Zusammenhang. Möglicherweise wird durch die Anwesenheit der Methylgruppe eine Metabolisierung erleichtert, und ein Metabolit, der polarer und somit besser wasserlöslich wäre als die Ausgangssubstanz könnte schneller an den Wirkort gelangen (wobei dies voraussetzt, daß die Wirkform wahrscheinlich nicht mehr im eingesetzten Stoff selbst besteht). Ob allerdings eine potentielle Metabolisierung direkt an der Methylgruppe stattfindet, ob die Methylgruppe lediglich eine bessere Andockmöglichkeit an metabolisierende Enzyme ermöglicht oder ob sonstige Transportmechanismen ablaufen, werden Untersuchungen zur Biotransformation und Pharmakokinetik klären müssen.

In einer weiteren Versuchsreihe wird 5-Methylindirubin in verschiedenen Dosierungen und in verschiedenen zeitlichen Mustern gegeben. Die Substanzgabe erfolgt intraperitoneal (i.p.) in einer Lösung von 5 % Methylcellulose in 30 % DMSO. Der Tumor wird 13 Tage vor der ersten Substanzgabe (= Tag 0) implantiert. Die behandelten Gruppen sowie die Kontrolle besteht aus je fünf Tieren. Dabei bewirkt 5-Methylindirubin ein Stoppen des Tumorwachstums bei niedriger Dosis (100 mg / kg Tag) mit täglicher Gabe und bei hoher Dosis (300 mg / kg Tag), die jeden dritten oder vierten Tag verabreicht wird. Eine niedrige Dosis (100 mg /kg Tag), die nur jeden zweiten Tag oder jeden dritten Tag verabreicht wird, kann das Tumorwachstum nicht stoppen, bewirkt aber noch eine Hemmung gegenüber der Kontrolle (**Tab. 76**). Auch bei dieser Versuchsreihe wird die Entwicklung des

Körpergewichts der Versuchstiere beobachtet und lediglich geringe Schwankungen um den 100 %-Wert registriert.

Tab. 76: Wachstumsverzögerung des Tumors LXFL 529 in der thymusaplastischen Nacktmaus durch 5-Methylindirubin (**36**) bei verschiedenen Dosierungsmustern

| 5-Methylindirubin (36) | 200 %- Wachstumsverzögerung (Tage) | 400 %- Wachstumsverzögerung (Tage) |
|--|---|---|
| 100 mg / kg Tag 0-4, 7-11 | 200 % wurden nicht erreicht | 400 % wurden nicht erreicht |
| 300 mg / kg Tag 0, 3, 7, 11, 14, 17, 21, 24 | 200 % wurden nicht erreicht | 400 % wurden nicht erreicht |
| 100 mg / kg Tag 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18 | 1 | 26 |
| 100 mg / kg Tag 0, 3, 7, 11, 14, 17, 21, 24 | 13 | 19 |

Weitere orientierende Versuche wurden mit **Isoindigo** und **3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol** durchgeführt. Die Substanzgabe erfolgte intraperitoneal (i.p.) als Lösung in DMSO. Der Tumor wurde 15 Tage vor der ersten Substanzgabe (= Tag 1) implantiert. Die behandelten Gruppen bestehen jeweils aus drei Tieren, die Kontrolle besteht aus fünf Tieren. Beide Substanzen zeigen hemmende Wirkung auf das Tumorstadium, vermögen es aber selbst bei höheren Dosierungen nicht zu stoppen (**Tab. 77**). Besonders für Isoindigo ist dies ein überraschendes Ergebnis, da sich die Zelllinie LXFL 529 sowohl im Colony-Forming-Assay ($IC_{70} = 5 \mu\text{M}$) als auch im SRB-Assay ($IC_{50} = 1 \mu\text{M}$) als sehr sensitiv für Isoindigo gezeigt hat.

Tab. 77: Wachstumsverzögerung des Tumors LXFL 529 in der thymusaplastischen Nacktmaus durch Behandlung 3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol (**48**) bzw. Isoindigo bei verschiedenen Dosierungsmustern

| | 200 %- Wachstumsverzögerung (Tage) | 400 %- Wachstumsverzögerung (Tage) |
|---|---|---|
| 3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol (48) 100 mg / kg Tag, 1-5, 8-12 | 4 | 4 |
| 3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol (48) 30 mg / kg Tag, 1-5, 8-12 | 6 | 8 |
| 3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol (48) 10 mg / kg Tag, 1-5, 8-12 | 0 | -3 ¹⁾ |
| Isoindigo (13) 300 mg / kg Tag, 1-5, 8-12 | 7 | 8 |
| Isoindigo (13) 100 mg / kg Tag, 1-5, 8-12 | 4 | 3 |
| Isoindigo (13) 30 mg / kg Tag, 1-5, 8-12 | 5 | 5 |

¹⁾ beschleunigtes Wachstum.

Ähnlich gering wirksam waren in ersten Tierversuchen das Natriumsalz der Indirubin-5-sulfonsäure, 5-Iodindirubin-3'-oxim und Indirubin-3'-oxim.

4.13 Röntgenstrukturanalytische Untersuchungen an CDK2

Von **CDK2/Indirubin-5-sulfonat** und **CDK2/Indirubin-3'-oxim** wurden kokristallisierte Enzym/Hemmstoffkomplexe röntgenstrukturanalytisch untersucht. Die Kristallisation sowie die Messung und Interpretation der Daten wurden von Dr. Jane Endicott an der Universität von Oxford (Großbritannien) durchgeführt.

Die 65 %ige Sequenzhomologie von CDK2 und CDK1 (Meyerson et al., 1992), ihre nahe verwandte Funktion, ihr gleiches Prinzip der Aktivierung und Deaktivierung durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung an entsprechenden Stellen und das fast identische Sensitivitätsmuster auf verschiedene CDK-Hemmstoffe (vgl. **Tab. 4**) läßt auf eine sehr große Ähnlichkeit der beiden Kinasen und ihrer katalytischen Zentren schließen. Da es bisher nicht gelang, CDK1-Kristalle zu züchten, muß sich das strukturbasierte Design von CDK1-Hemmstoffen auf die Struktur von CDK2 stützen.

CDK2 besteht aus zwei Domänen und ist mit 33,9 kDa ein relativ kleines Enzym, das kaum mehr als den katalytischen Kern der Proteinkinasefamilie enthält. Die kleinere, N-terminale Domäne mit ungefähr 80 Aminosäuren besteht in erster Linie aus β -Faltblättern, die größere, C-terminale Domäne mit ungefähr 210 Aminosäuren enthält in erster Linie α -Helices (siehe **Abb. 95**).

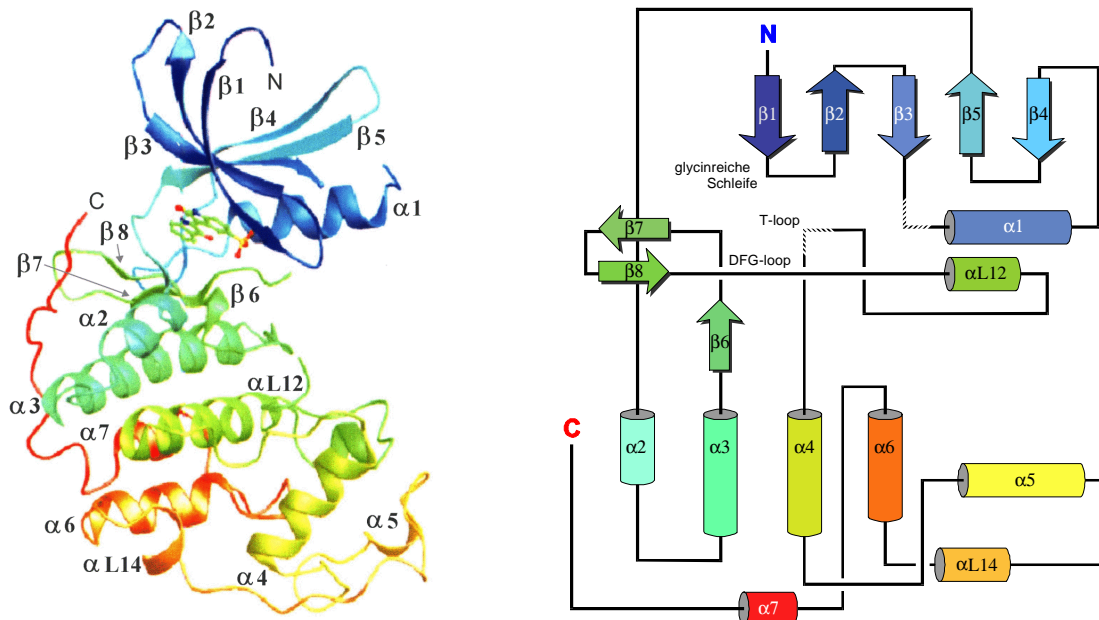


Abb. 95: links: Gesamtstruktur von CDK2 im Komplex mit Indirubin-5-sulfonat (**29b**). Rot: C-terminales Ende, blau: N-terminales Ende; α -Helices sind als spiralförmige Bänder, β -Faltblätter als glatte Bänder, Schleifenbereiche als Schnüre dargestellt. Die Bereiche zu geringer Elektronendichte (der *T-loop* zwischen $\alpha 4$ und $\alpha L 12$ und ein kurzer Bereich zwischen $\beta 3$ und $\alpha 1$) sind nicht dargestellt.

rechts: schematische Darstellung von CDK2 (nach De Bondt et al., 1993), α -Helices sind als Zylinder, β -Faltblätter als Pfeile, Schleifenbereiche als Linien dargestellt. Die Bereiche geringer Elektronendichte (der *T-loop* zwischen $\alpha 4$ und $\alpha L 12$ und ein kurzer Bereich zwischen $\beta 3$ und $\alpha 1$) sind gestrichelt dargestellt.

Sie enthält zwei sehr flexible Bereiche, die deswegen nur eine geringe Elektronendichte erzeugen; ein Effekt, der schon mehrfach beobachtet wurde (vgl. De Bondt et al., 1993; Schulze-Gahmen et al., 1995; Lawrie et al., 1997). Dies ist zum einen der Bereich zwischen der Faltblattstruktur $\beta 3$ und der Helix $\alpha 1$ (Arg 36 bis Gly43) und zum anderen der Bereich einer Schleife, des sogenannten *T-loops* zwischen den Helices $\alpha 4$ und $\alpha L12$, die das im vollständig aktivierten CDK/Cyclin A-Komplex phosphorylierte Thr160 enthält (vgl. Russo et al. 1996). In den beiden hier vorgestellten Strukturen sind dies Leu148 bis Glu162 im Komplex mit Indirubin-5-sulfonat und Phe152 bis Glu162 im Komplex mit Indirubin-3'-oxim. Bisher aufgeklärte Wirkmechanismen von CDK-Hemmstoffen zeigten stets eine kompetitive Hemmung der ATP-Bindung. Auch bei Indirubin-5-sulfonat und Indirubin-3'-oxim scheint die Konkurrenz um die ATP-Bindungsstelle ausschlaggebend für die Hemmung zu sein. **Abb. 96** und **Abb. 97** zeigen die Lage von Indirubin-3'-oxim bzw. Indirubin-5-sulfonat zwischen den die ATP-Bindungstasche ausbildenden Aminosäuren. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Inhibitor und dem Protein wurden mit dem *CCP4-Programm Contact* (Collaborative Computational Project, 1994) berechnet.

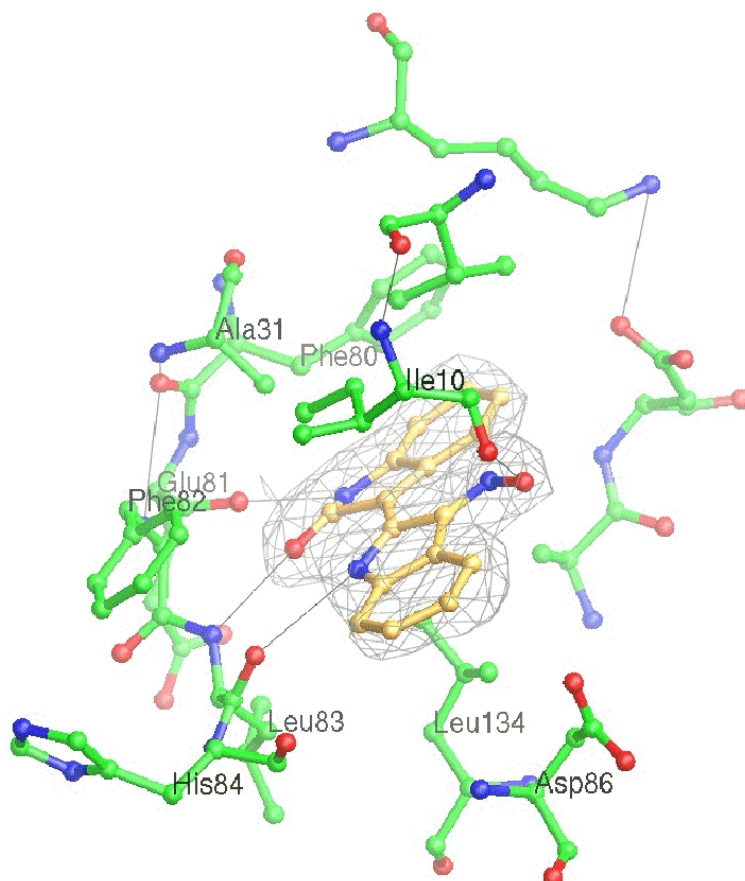


Abb. 96: Indirubin-3'-oxim (**91**) und die unmittelbar benachbarten Aminosäuren der ATP-Bindungstasche von CDK2. Wasserstoffbrückenbindungen sind durch Linien angedeutet.

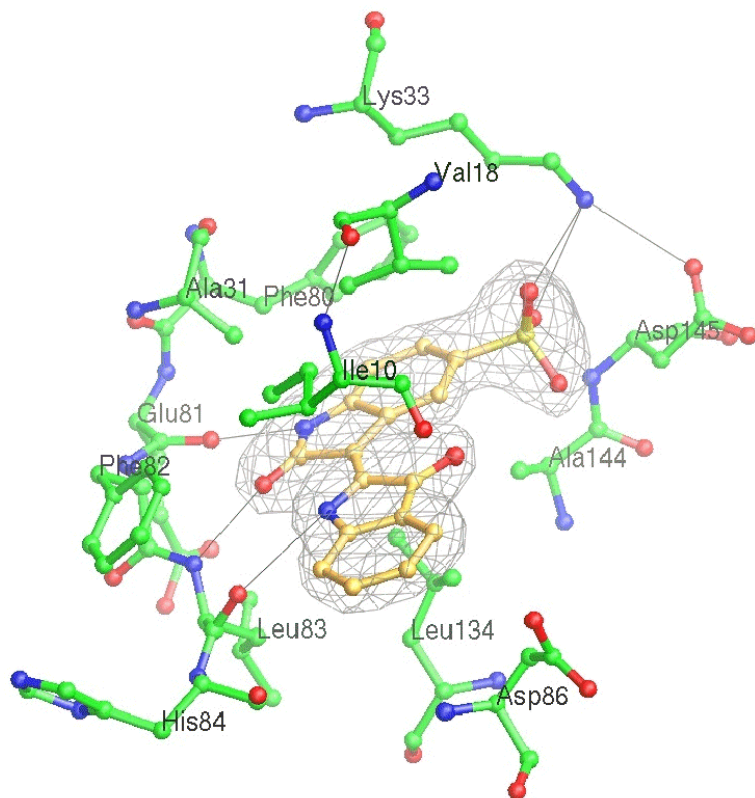


Abb. 97: Indirubin-5-sulfonat (**29b**) und die unmittelbar benachbarten Aminosäuren der ATP-Bindungstasche von CDK2. Wasserstoffbrückenbindungen sind durch Linien angedeutet. Bemerkenswert ist die Konformationsänderung von Lys33 und Asp145 im Vergleich zur Indirubin-3'-oximstruktur (siehe auch **Abb. 103**).

Das Indirubingrundgerüst der beiden Derivate ist räumlich nahezu identisch angeordnet. Es bildet mit dem Protein drei Wasserstoffbrückenbindungen aus: vom Wasserstoff des Lactamstickstoffs zum Hauptkettensauerstoff von Glu81, vom Wasserstoff der Amidgruppe des Leu83 zum Lactamsauerstoff des Indirubins und vom Wasserstoff des anderen Ringstickstoffs zum Sauerstoff von Leu83 (siehe **Abb. 96** und **Abb. 97**). Damit bilden die Indirubinderivate, verglichen mit anderen CDK2-Inhibitoren oder ATP, eine Wasserstoffbrückenbindung mehr zur Hauptkette aus. Vergleichbar zu Isopentenyladenin (Schulze-Gahmen et al., 1995), Staurosporin (Lawrie et al., 1997) und ATP (De Bondt et al., 1993) sind die Wasserstoffbrückenbindungen zu dem Hauptkettensauerstoff von Glu81 und der Amidgruppe von Leu83. Zusätzlich bilden die Indirubinderivate, genauso wie Olomoucine (Schulze-Gahmen et al., 1995) und Roscovitin (De Azevedo et al., 1997) - denen allerdings der entsprechende Kontakt zu Glu81 fehlt - die dritte Wasserstoffbrückenbindung mit Leu83 aus. Im Bereich der Aminosäuren Phe80 bis His84 ist die Form des Indirubinmoleküls komplementär zu der gekrümmten Form der ATP-Bindungstasche. Dieses genaue Einpassen in die ATP-Bindungsstelle beobachtet man auch bei Roscovitin (**Abb. 98**) und Staurosporin (**Abb. 99**).

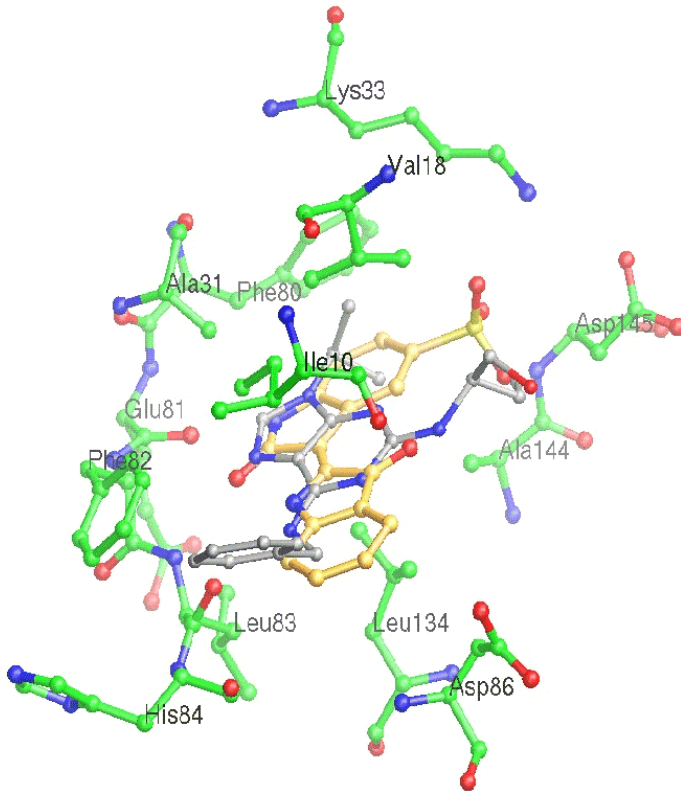


Abb. 98: Überlagerung der CDK2/Indirubin-5-sulfonat-Struktur mit Roscovitin (**53**) in seiner entsprechenden räumlichen Lage. Die Bereiche der beiden Fünfringe des Indirubinderivats (**29b**) (gelb) einerseits und der Fünfring des Purinsystems und der Stickstoff der Benzylaminogruppe von Roscovitin (**53**) (grau/blau) andererseits befinden sich an nahezu gleichen Stellen innerhalb der ATP-Bindungstasche.

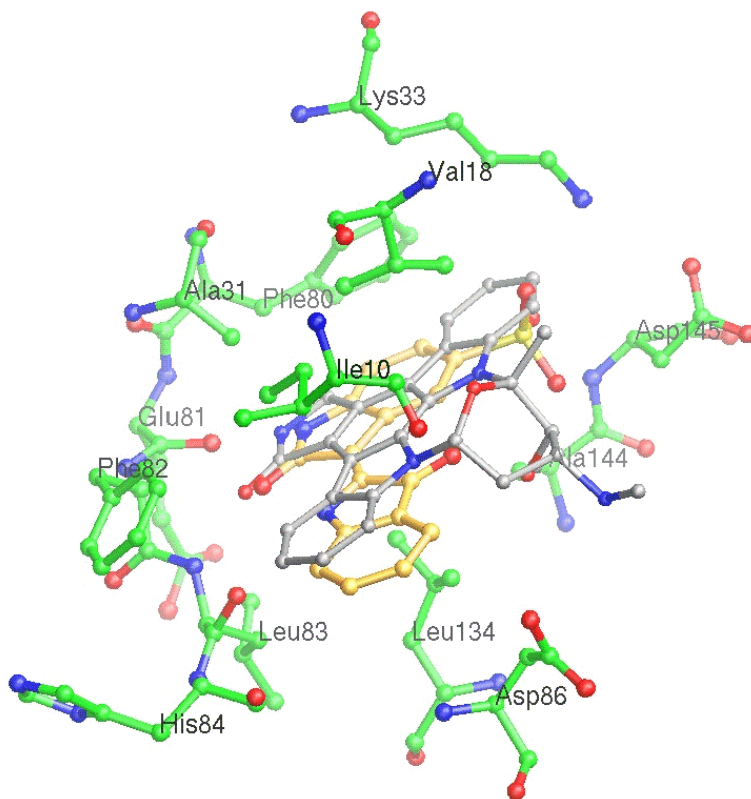


Abb. 99: Überlagerung der CDK2/Indirubin-5-sulfonat-Struktur mit Staurosporin (**56a**) in seiner entsprechenden räumlichen Lage. Die Lactamfunktion von Staurosporin (**56a**) (grau/blau) befindet sich an nahezu der gleichen Stelle wie jene von Indirubin-5-sulfonat (**29b**) (gelb). Eines der beiden Indolsysteme von **56a** kommt etwas "oberhalb" des gestrichenen Indolsystems von **29b** zu liegen. **29b** ist, ähnlich wie Staurosporin (**56a**) und Roscovitin (**53**), dem Bereich Phe80 bis His84 sehr gut angepaßt.

Indirubin-5-sulfonat und Indirubin-3'oxim (**87**) bilden außerdem eine Reihe unpolarer Kontakte mit den Seitenketten der hochkonservierten Aminosäuren der ATP-Bindungstasche, die möglicherweise den Hauptbeitrag zur starken Bindung an CDK2 liefern. Beide gehen zum Beispiel eine Wechselwirkung mit Phe80 ein (**Abb. 100** und **Abb. 101**) und füllen so diese Seite der Bindungstasche besser aus als ATP (De Bondt, 1993) oder Staurosporin (Lawrie et al., 1997) (**Abb. 99**). Diese Wechselwirkung wird allerdings auch von Roscovitin ausgeübt; die N9-Isopropylgruppe zeigt auf Phe80 (De Azevedo et al. 1997) (**Abb. 98**). In **Abb. 100**, **Abb. 101** und **Abb. 102** ist der Bereich um die ATP-Bindungstasche teilweise als *Connolly*-Oberfläche dargestellt. Eine *Connolly*-Oberfläche entsteht, wenn eine Kugel mit dem effektiven Radius eines Wassermoleküls (etwa 1,4 Å) über ein Modell gerollt wird. Die entstehende, glatte Oberfläche stellt jene Form dar, die von einem Wassermolekül berührt werden kann (Connolly, 1983; Connolly, 1985). In den Abbildungen sind besonders die lipophilen Wechselwirkungen gut zu erkennen.

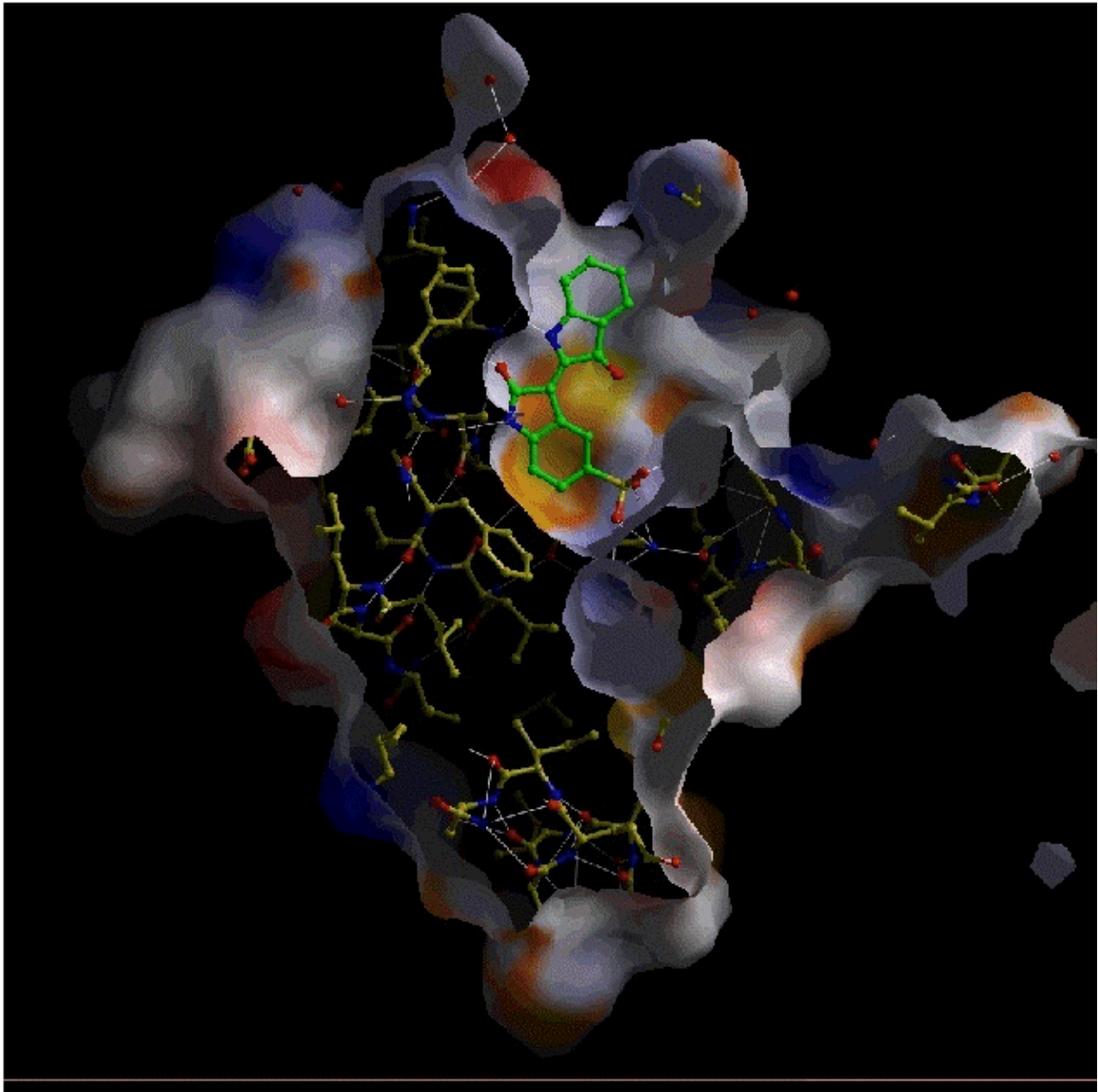


Abb. 100: Der Bereich um die ATP-Bindungstasche ist teilweise als *Connolly*-Oberfläche dargestellt. Rot eingefärbte Bereiche deuten eine negative Ladungsdichte an, blau eingefärbte Bereiche eine positive Ladungsdichte, orange symbolisiert lipophile Bereiche. In der Bindungstasche liegt Indirubin-5-sulfonat (**29b**). Der Benzolkern mit dem Sulfonatsubstituenten liegt sehr energiegünstig genau zwischen zwei lipophilen Bereichen (siehe auch **Abb. 101**)

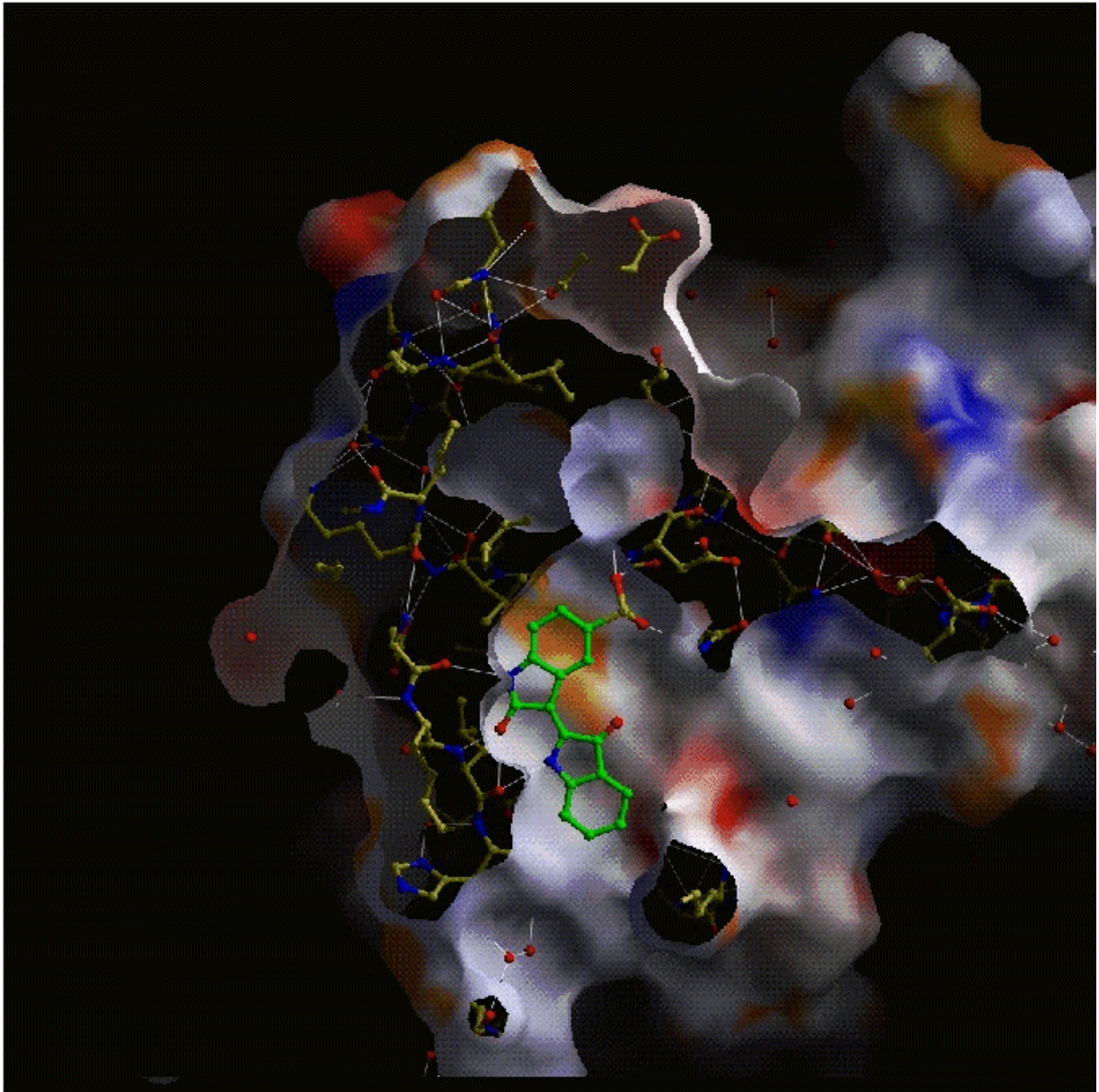


Abb. 101: Der Bereich um die ATP-Bindungstasche ist teilweise als *Connolly*-Oberfläche dargestellt. Rot eingefärbte Bereiche deuten eine negative Ladungsdichte an, blau eingefärbte Bereiche positive Ladungsdichte, orange symbolisiert lipophile Bereiche. In der Bindungstasche liegt Indirubin-5-sulfonat (**29b**). Der Benzolkern mit dem Sulfonatsubstituenten liegt sehr energiegunstig genau zwischen zwei lipophilen Bereichen (siehe auch **Abb. 100**)

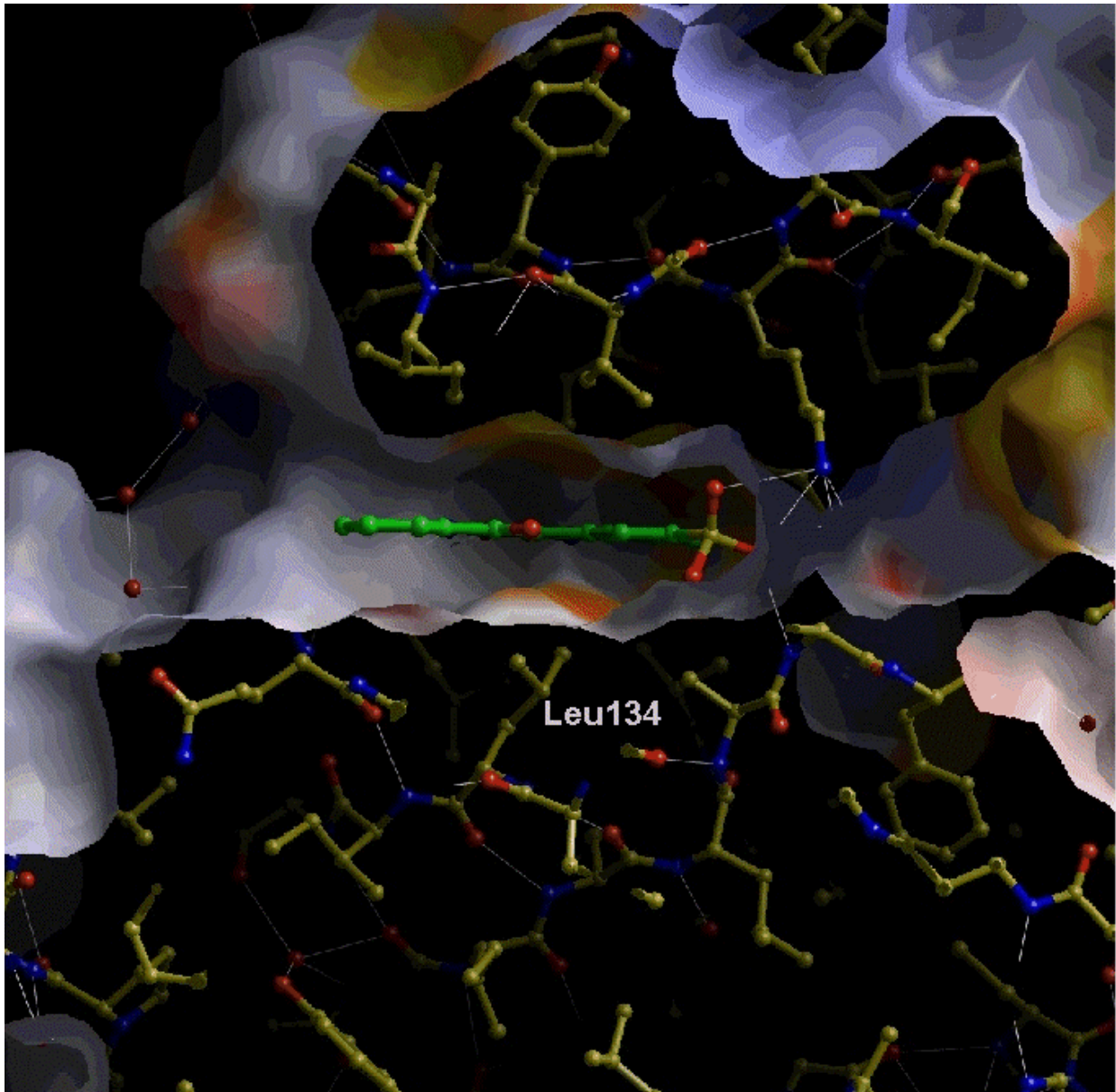


Abb. 102: Der Bereich um die ATP-Bindungstasche ist teilweise als *Connolly*-Oberfläche dargestellt. "Von unten" deutet die Seitenkette von Leu134 auf den substituierten Benzolkern von Indirubin-5-sulfonat (**29b**) und vermittelt so einen Teil der lipophilen Wechselwirkung zwischen Enzym und Inhibitor.

Im Komplex zwischen Indirubin-5-sulfonat und CDK2 ist anhand der gemessenen Elektronendichte eine Lokalisation der Aminosäuren bis Gly147 möglich. Die Lage der folgenden, sich um die Phosphorylierungsstelle Thr160 gruppierenden Aminosäuren, kann nicht mehr bestimmt werden. Die nächste exakt bestimmbare Aminosäure ist Val163. Ein Teil der hohen Affinität von Indirubin-5-sulfonat zu CDK2 bewirkt neben den lipophilen Wechselwirkungen die ionische Wechselwirkung mit Lys33. Wie die α -Phosphatgruppe von ATP (De Bondt et al., 1933) wechselwirkt auch die Sulfonatgruppe von Indirubin-5-sulfonat mit der Aminogruppe von Lys33. Zusätzlich stellen die Sulfonatsauerstoffatome einen Kontakt zum Hauptkettenstickstoff von Asp145 (**Abb. 103**) und zum Seitengruppenamid von Asn132 her (Endicott, persönliche Mitteilung, 1998; nicht abgebildet) und bewirken eine Abstoßung der Seitengruppe von Asp145. Diese Wechselwirkungen sind mit einer Umstrukturierung

des sogenannten *DFG-loops* (zwischen $\beta 8$ und $\alpha L12$) in Folge der Umorientierung von Lys33 verbunden (**Abb. 103**). Als *DFG*-Motiv bezeichnet man die Aminosäuresequenz Asp (D) - Phe (F) - Gly (G), die in den meisten Proteinkinasen zu finden ist (hier: Asp145 - Phe146 - Gly147).

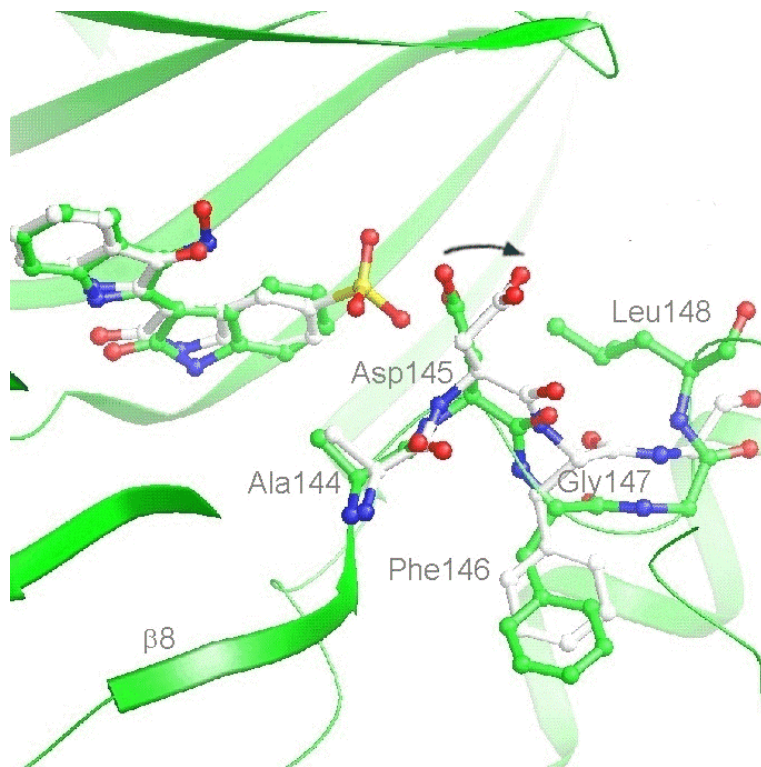


Abb. 103: Indirubin-5-sulfonat (**29b**) verursacht, ähnlich wie Staurosporin (**56a**), eine Konformationsänderung im *DFG*-Motiv, die im Komplex mit Indirubin-3'-oxim (**87**) nicht beobachtet wird. Der Pfeil deutet die formale Verschiebung der Carboxylgruppe von Asp145 an, wenn Indirubin-3'-oxim (**87**) durch Indirubin-5-sulfonat (**29b**) ausgetauscht wird. Die Carboxylgruppe entfernt sich von der Sulfonatgruppe und behält dabei den Kontakt zu Lys33 (siehe **Abb. 97**). Die Seitenkette von Leu148 wird aus dem Bildbereich hinausgedreht.

An CDK2 gebundenes Staurosporin ruft eine ähnliche Konformationsänderung hervor. Sie resultiert dort aus der Abstoßung zwischen Asp145 und einem der Benzolkerne des Staurosporins. Die Sulfonatgruppe besetzt zwar den gleichen Raumbereich wie dieser Benzolring (**Abb. 99**), durch die Ladung und der damit einher gehenden Fähigkeit, eine starke Wasserstoffbrückenbindung zum protonierten Lys33 auszubilden, paßt sich Indirubin-5-sulfonat in diesem Bereich aber besser an die komplementäre Proteinstruktur an als Staurosporin. Infolgedessen sind die beiden Strukturen nicht koplanar.

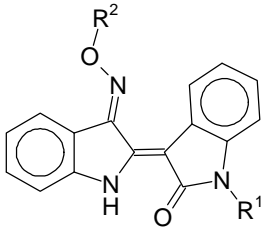
Im Komplex zwischen Indirubin-3'-oxim und CDK2 ist eine Lokalisation der Aminosäuren bis zu Ala 151 möglich. Der *T-loop* ist hier also um vier Aminosäuren weiter geordnet als in der Struktur mit Indirubin-5-sulfonat. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Strukturen ist die Stellung von Asp145. Im Komplex mit Indirubin-3'-oxim steht Asp145 aufgrund der fehlenden Abstoßung wesentlich näher am Indirubingrundgerüst (**Abb. 103**). Die Oximfunktion zeigt in Richtung der Position der Ribosegruppe von ATP und steht somit in der Nähe von Ile10 (**Abb. 96**), geht jedoch keine direkten Wechselwirkungen mit CDK2 ein, im Gegensatz zu zum Beispiel Staurosporin (Lawrie et al., 1997), das in diesem Raumbereich einen Pyranring trägt. Infolgedessen ist die glycinreiche Schleife zwischen

β 1- und β 2-Faltblatt (Gly11 bis Gly16) im CDK2/Staurosporin Komplex signifikant weniger flexibel. Die Oximgruppe eröffnet hier die Möglichkeit, weitere funktionelle Gruppierungen einzubringen und so die Hemmstärke und die Selektivität der Indirubinderivate weiter zu steigern. Die Flexibilität der CDK2-Struktur in diesem Bereich erschwert es andererseits, über die Auswirkung eines Substituenten Vorhersagen zu machen. So geht überraschenderweise die unpolare Methylgruppe am Pyranring von Staurosporin Wechselwirkungen mit den polaren Seitenketten ein. Um in diesem Molekülbereich zuverlässige Vorhersagen über die Wirkqualität weiterentwickelter Hemmstoffe machen zu können, müßten röntgenstrukturanalytische Untersuchungen an aktivem CDK2 im Komplex mit Cyclin A und Inhibitor vorgenommen werden.

Trotz der großen Ähnlichkeit der beiden Kinasen CDK1 und CDK2 muß die Möglichkeit eingeräumt werden, daß ein Unterschied auch in der katalytischen Region besteht, der eine Optimierung eines Hemmstoffs für die CDK1 anhand der Struktur der CDK2 nur bis zu einer gewissen Grenze zuläßt. CVT-313, ein dem Roscovitin ähnliches Molekül, das den CDK2/Cyclin A-Komplex etwa acht mal stärker hemmt als den CDK1/Cyclin B-Komplex (Brooks et al., 1997) oder Purvalanol A, das den CDK1/Cyclin B-Komplex etwa 17 mal stärker hemmt als den CDK2/Cyclin A-Komplex (Gray et al., 1998), zeigen diese Grenze auf.

Wie in dieser Arbeit und von Wu et al. (1982) gezeigt wurde, sprechen starke Indizien dafür, daß Indirubin und seine Derivate interkalativ an die DNA binden. Li et al. (1996) beobachteten in einem Leukämiemodell an der Maus eine signifikante Reduzierung der antileukämischen Eigenschaften, wenn in einer Reihe von Derivaten des Indirubin-3'-oxims (**87**) der Lactamstickstoff methyliert wird (siehe **Tab. 78**). Die Wechselwirkung mit CDK2 würde durch die Methylgruppe am Lactamstickstoff entscheidend geschwächt, denn die Wasserstoffbrückenbindung zu Glu81 wäre nicht mehr möglich.

Tab. 78: Wirkung von Indirubin-3'-oximderivaten, *in vivo* an der Mäuseleukämie L7212 und *in vitro* an humanen Leukämiezellen 30 verschiedener Patienten (Li et al., 1996); das am Lactamstickstoff methylierte Derivat **106** ($R^1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{CH}_3$) zeigt keine antileukämische Aktivität mehr.

|  | | | L7212 | Anteil der sensitiv reagierenden Leukämien bei 10 µg/ml |
|---|-----------------|-------------------------------|-------|---|
| | R ¹ | R ² | | |
| | H | H | 108 | 19/30 |
| 87 | H | H | 108 | 19/30 |
| 104 | H | CH ₃ | 130 | 28/30 |
| 105 | H | C ₂ H ₅ | 124 | 23/30 |
| 106 | CH ₃ | CH ₃ | 89 | 2/30 |
| 11 | Indirubin | | 118 | 21/30 |

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, daß eine Substitution in Position 1 des Indirubins sowohl die Wechselwirkung mit der DNA (Kapitel 4.6) als auch die Inhibierung des Enzymkomplexes CDK1/Cyclin B (Kapitel 4.7) beeinflusst. Dabei ist der Abfall der Hemmwirkung auf den Enzymkomplex wesentlich deutlicher als die Abschwächung der Ethidiumverdrängung aus der DNA.

Dies unterstützt die Hypothese, daß die antileukämische Wirkung sowie die an zahlreichen Zelllinien beobachtete Zytotoxizität der Indirubinderivate von ihrer Fähigkeit herrühren, CDKs zu hemmen. Doch auch die, möglicherweise interkalative Wechselwirkung mit der DNA scheint eine Rolle zu spielen.

Augenblicklich ist bei der Optimierung der Wirkstärke und Selektivität die Orientierung an der hier vorgestellten Röntgenstrukturanalyse die Methode der Wahl. Gleichzeitig schränkt die Lipophilie der Substanz im Hinblick auf die Permeabilität von Zellmembranen die Auswahl der Substituenten ein. Modifikationen an der Leitstruktur sollten sich deshalb innerhalb folgender Eckpunkte bewegen:

- Die beiden Stickstoffatome im Indirubingrundgerüst sowie der Lactamsauerstoff dürfen keine Änderung erfahren. Sie bilden drei entscheidende Wasserstoffbrückenbindungen mit CDK2 aus.
- Die Substitution in der 5-Position sollte beibehalten werden. Alle in 5-Position substituierten Derivate hemmen CDK1/Cyclin B stärker als Indirubin (**Tab. 64**). Eine Verlagerung der Substitutionsstelle auf die 6-Position resultiert in einem Abfall der Hemmwirkung auf etwa ein Zwanzigstel (IC_{50} von 5-Iodindirubin = 0,3 µM; IC_{50} von 6-Iodindirubin = 6,5 µM, Thommet, 1998). In **Abb. 100** erkennt man, wie eine Substitution in 6-Position zu sterischen Hinderungen führt.
- Die Sulfonatgruppe wechselwirkt zwar sehr stark mit Lys33 und führt so zu einer großen Affinitätssteigerung, jedoch sollte eine ionische Gruppe vermieden werden, da Zellmembranen

für geladene Verbindungen kaum permeabel sind. Der optimale Wert für $\log P_{ow}$ liegt im Bereich 3 bis 4 (siehe Kap.4.9). Dies ist wahrscheinlich der Grund dafür, daß die stärksten CDK1-Inhibitoren im Colony-Forming-Assay (Kapitel 4.8.1) und im SRB-Assay (Kapitel 4.11) kaum einen Effekt zeigen. Als Alternative bietet sich hier eine polare aber nichtionische Gruppe wie zum Beispiel die Sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid-Gruppierung an. Der IC_{50} -Wert von Indirubin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid beträgt $0,10 \mu M$ und reicht damit fast an Indirubin-5-sulfonsäure ($0,055 \mu M$) heran.

- Das Molekül sollte durch Substitution des Oximprotons vergrößert werden. ATP besitzt in diesem Bereich seinen polaren Ribosering. Staurosporin geht mit einer unpolaren Methylgruppe in dieser Richtung mit den entsprechenden Aminosäuren Wechselwirkungen ein. So bieten sich zunächst sowohl polare (zum Beispiel glykosidisch gebundene Zucker) als auch unpolare Substituenten (zum Beispiel Methyl, Ethyl oder Benzyl) an.
- In der Bindungstasche scheint außerdem Platz für eine kleine Modifikation in Position 4' (Methyl oder Hydroxyl) vorhanden zu sein (**Abb. 100** und **Abb. 101**).

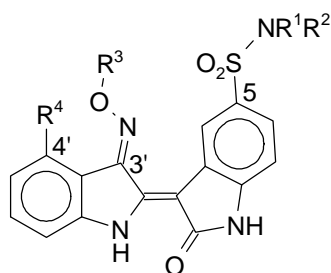


Abb. 104: Substituentenvorschlag, um die Hemmwirkung und Selektivität von Indirubinderivaten für CDK1 und CDK2 zu steigern.

R^1, R^2 = polare, nichtionische Gruppen (zum Beispiel 2-Hydroxyethyl)

R^3 = polare, nichtionische oder unpolare Gruppe (zum Beispiel β -D-Glucopyranosyl, Methyl, Ethyl oder Benzyl)

R^4 = kleine polare, nichtionische oder unpolare Gruppe wie Hydroxyl oder Methyl.

5 Zusammenfassung

Indirubin ist als antileukämischer Inhaltsstoff in Zubereitungen der traditionellen chinesischen Medizin erkannt und seine antineoplastische Wirkung in einer klinischen Studie an Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie gezeigt worden. Ziel dieser Arbeit war es, bekannte und neue Indirubinderivate zu synthetisieren und Indizien für den Wirkmechanismus indigoide Bisindole zu finden. Ein Schwerpunkt sollte dabei in der Darstellung von in 5- und 3'-Stellung substituierten Indirubinderivaten liegen.

Unter den 19 synthetisierten Indirubinderivaten sind die zehn neuen Verbindungen 5-Fluorindirubin, 5-Nitroindirubin, 5,5'-Dibromindirubin, das Natriumsalz der 5'-Bromindirubin-5-sulfonsäure, 5-Iodindirubin-3'-oxim sowie fünf Indirubin-5-sulfonsäureamidderivate. An der Verbindungsklasse wurden detaillierte NMR-spektroskopische Untersuchungen vorgenommen. Außerdem wurden Isoindigo und die beiden Bisindolderivate 2,2'-Bisindol sowie 3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol dargestellt. Identität und Reinheit der synthetisierten Verbindungen wurden mittels Dünnschichtchromatographie, Elementaranalyse, Massenspektroskopie, Gaschromatographie/Massenspektroskopie, UV-Spektroskopie sowie $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektroskopie nachgewiesen. Ergänzt durch kommerziell erhältliche Indigoderivate stand damit eine Auswahl an 2',3-, 2,2'- und 3,3'-Bisindolderivaten zur Verfügung.

Bei cyclovoltammetrischen Untersuchungen an Indirubin und 5-Iodindirubin wurden im beobachteten Spannungsbereich bei beiden Derivaten eine im Sinne der Cyclovoltammetrie irreversible Oxidation und zwei reversible Reduktionen registriert. Die Höhe der Wellen deutet darauf hin, daß das Indirubinsystem bei den beiden Reduktionen jeweils ein Elektron aufnimmt und bei der Oxidation zwei Elektronen abgibt. Zumindest die erste Reduktion liegt mit einem Halbwellenpotential von $-0,8\text{ V}$ in einem Bereich, der physiologisch zugänglich sein sollte. Eine Überführung in eine der vorgeschlagenen oxidierten oder reduzierten Strukturen hätte mit großer Wahrscheinlichkeit eine bessere Löslichkeit und damit eine erhöhte Transportfähigkeit der Indirubinderivate in wäßrigen Systemen zur Folge.

Die Ergebnisse des Ethidiumbromidverdrängungsassays deuten darauf hin, daß einige Indirubinderivate interkalative Wechselwirkungen mit der DNA eingehen können. Bei 5-Fluorindirubin, Indirubin-3'-oxim und Indirubin-5-sulfonamid kann ein ED_{50} -Wert bestimmt werden, der fast in der Größenordnung des starken Inerkalators Doxorubicin liegt. Eine Beteiligung der Interkalation am Wirkmechanismus scheint bei 5-Fluorindirubin und Indirubin-3'-oxim möglich, denn beide hemmen im gleichen Konzentrationsbereich das Wachstum im Sulforhodamin B-Assay und im Colony-Forming-Assay.

Im Colony-Forming-Assay ist Isoindigo die aktivste Substanz. Indirubinderivate haben durchschnittliche IC_{70} -Werte, die eine Größenordnung höher liegen. Die drei Indirubinderivate mit einer freien Sulfonsäuregruppe sowie Indigo sind kaum wirksam. Die sulfonierten Indigoderivate sind inaktiv. Die beiden Melanomzelllinien MEXF 989 und MEXF 515LX zeichnen sich gegenüber einigen Verbindungen durch eine bis um den Faktor 75 unterschiedliche Sensitivität aus. Die Mammakarzinomzelllinie MCF 7 wird von den meisten der Indirubinderivaten sowie von den beiden 2,2'-Bisindolderivaten stärker gehemmt als der Durchschnitt. Im Luciferase-Assay an transfizierten MCF 7-Zellen kann kein Hinweis auf eine hormonrezeptorgekoppelte Wirkung gefunden werden. Im Sulforhodamin B-Assay sind Isoindigo und Indirubin-3'-oxim die wirksamsten Substanzen. Dies bestätigt das Ergebnis der durchschnittlichen Wirksamkeit in den Colony-Forming-Assays.

Die geringe absolute Löslichkeit sowohl in der lipophilen als auch in der hydrophilen Phase verhindert bei etwa der Hälfte der Verbindungen eine exakte Bestimmung des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten. Dennoch wird für die restlichen Indirubinderivate eine gute Korrelation zwischen dem durchschnittlichen IC_{70} -Wert im Colony-Forming-Assay und der Lipophilie der Substanzen gefunden. Das Optimum des $\log P_{ow}$ bewegt sich für Indirubinderivate in Bezug auf Wachstumshemmung im Colony-Forming-Assay in einem Bereich von 3 bis 4.

In ersten, orientierenden *in vivo*-Versuchen an thymusaplastischen Nacktmäusen, die das großzellige Lungenkarzinom LXFL 529 tragen, kann Indirubin und 5-Chlorindirubin das Tumorstadium verzögern aber nicht stoppen. 5-Methylindirubin, das schneller als die beiden anderen Derivate aus dem Injektionsbereich transportiert wird, kann ab etwa dem zehnten Tag der Behandlung das Tumorstadium stoppen. Das Gesamtgewicht der Versuchstiere bleibt dabei konstant oder steigt leicht an. 5-Methylindirubin ist somit ein aussichtsreicher Kandidat für eine Weiterentwicklung in Richtung eines antineoplastischen Medikaments.

Ausgehend von Indirubin kann durch die Variation der Substituenten eine Steigerung der Hemmwirkung am isolierten Enzymkomplex CDK1/Cyclin B um den Faktor 1200 erreicht werden. Das Natriumsalz der 3'-Hydroxyiminoindirubin-5-sulfonsäure hat einen IC_{50} -Wert von 0,0083 μM . Die Substanzklasse besitzt außerdem eine hohe Selektivität gegenüber anderen Kinasen und übertrifft somit in Wirksamkeit und Selektivität die meisten bekannten CDK-Hemmstoffe.

Für Isoindigo kann keine Hypothese zum Wirkmechanismus aufgestellt werden. Seiner hohen Aktivität im Colony-Forming-Assay und im Sulforhodamin B-Assay steht eine nur äußerst geringe Interkationsfähigkeit sowie eine kaum vorhandene Fähigkeit zur Hemmung des Enzymkomplexes CDK1/Cyclin B gegenüber.

In einer Röntgenstrukturanalyse von humaner CDK2 im Komplex mit Indirubin-5-sulfonat bzw. Indirubin-3'-oxim wird deutlich, daß sich die Inhibitoren in die ATP-Bindungstasche einlagern. Im Be-

reich der Aminosäuren Phe80 bis His84 ist die Form der Indirubinmoleküle komplementär zu der gekrümmten Form der ATP-Bindungstasche, ein Effekt wie er auch bei anderen CDK-Hemmstoffen beobachtet wurde. Die Ausbildung von drei Wasserstoffbrückenbindungen sowie lipophile Wechselwirkungen sind essentiell für die starke Bindung beider Derivate. Anhand der Struktur wird deutlich, daß die 5-Position die ideale Substitutionsposition an den Benzolkernen darstellt. Indirubin-5-sulfonat bildet durch die Sulfonatgruppe ionische Wechselwirkungen mit einer Lysinseitenkette (Lys33) des Enzyms aus, die zu einer weiteren Affinitätssteigerung führen. Die Oximgruppe in Position 3' ragt in einen freien Raumbereich, der von anderen Hemmstoffen besetzt wird und eröffnet daher die Möglichkeit, weitere funktionelle Gruppierungen einzubringen und so die Hemmstärke und die Selektivität der Indirubinderivate noch zu steigern.

Läßt man die ionischen Verbindungen, die aufgrund ihrer Ladung die Zellmembran (und Zellkernmembran) wahrscheinlich nicht durchdringen können außer Betracht, so fällt auf, daß alle starken Inhibitoren des Enzymkomplexes CDK1/Cyclin B auch zu einer starken Wachstumshemmung im Colony-Forming-Assay führen. Eine Schwächung der Affinität zwischen Inhibitor und CDK1 durch eine Substitution am N1-Stickstoff führt gleichzeitig zu einem Abfall der Wirksamkeit im Colony-Forming-Assay und in anderen Testsystemen (Li et al., 1996). Durch die Röntgenstrukturanalyse wird verständlich, wie eine Substitution an dieser Stelle die Wechselwirkung zwischen Inhibitor und Enzym abschwächt.

Die Befunde deuten darauf hin, daß der antineoplastischen Wirkung von Indirubinderivaten ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Teilmechanismen zugrunde liegt, möglicherweise unter Beteiligung von Interkalation und *Redoxcycling*, wobei der Hauptwirkmechanismus in der Inhibierung cyclinabhängiger Kinasen besteht.

6 Experimenteller Teil

6.1 Geräte und Materialien

Geräte

| | |
|------------------|---|
| Gefriertrockner: | Christ Alpha |
| Vakuumpumpe: | Brand vakUbrand, Drehschieber-Vakuumpumpe |
| Ultraschallbad: | Sonorex RK 102 H (Bandelin) |
| Waage : | Mettler AE 163 |

Dünnschichtchromatographie

| | |
|--------------------------|--|
| DC-Kieselgel-Folien: | DC-Alufolien, Alugram Sil, G/UV ₂₅₄ ; Macherey & Nagel. |
| DC-RP-18-Folien: | DC-Alufolien, RP-18 F ₂₅₄ ; Merck. |
| DC-Aluminiumoxid-Folien: | DC-Alufolien, Aluminiumoxid 150 F ₂₅₄ , neutral (Typ T); Merck. |
| Säulenmaterial | Kieselgel Typ 60 (0,063-0,2 mm); Macherey & Nagel. Aluminiumoxid ICN Alumina Super I (0 % H ₂ O); ICN Biomedicals. |

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich, Fluka, Merck und Riedel-de-Haen bezogen. Wenn nicht anders angegeben, hatten die für die Umsetzungen verwendeten Lösungsmittel p.a.-Qualität oder wurden vor Gebrauch frisch destilliert und gegebenenfalls nach den gängigen Methoden getrocknet.

Verwendetes Wasser war, wenn nicht anders angegeben, bidestilliert.

Als Schutzgas diente Argon.

6.2 Synthesen

6.2.1 Isatin- und Indirubinderivate

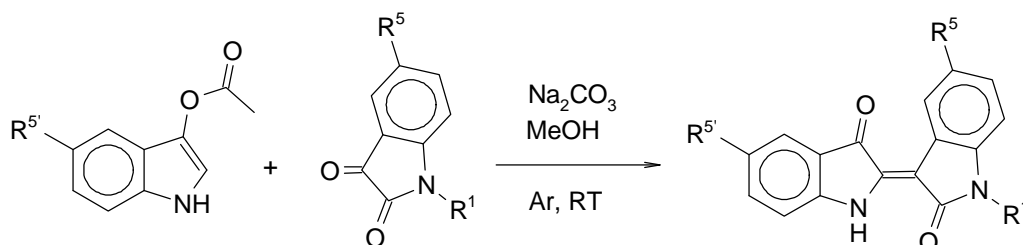


Abb. 105: Allgemeines Schema für die Synthese der Indirubinderivate

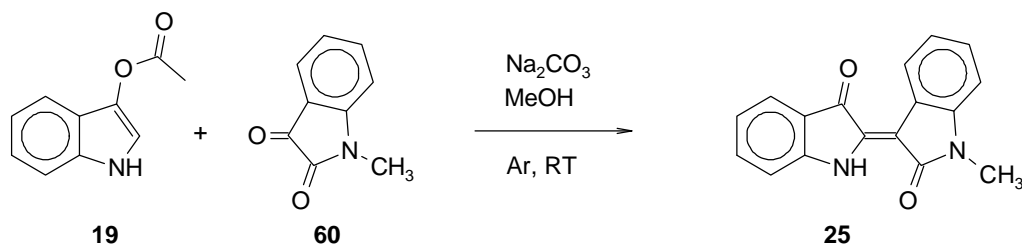
Die Synthesen der Indirubinderivate erfolgen analog einer Reaktionsvorschrift von Russell et al. (1969). Die Aufarbeitung ist modifiziert.

Allgemeine Synthesevorschrift **SYN**: Entsprechend substituierte Isatin- und Indoxylacetatderivate werden unter Schutzgas mit Methanol versetzt. Nach Zugabe von Natriumcarbonat und gegebenenfalls

weiterem Methanol wird die Mischung 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Man läßt die Reaktionsmischung 24 h bei Raumtemperatur stehen und filtriert dann durch eine Glasfritte (4). Der Rückstand wird mit wenig Methanol und viel Wasser bis zur neutralen Reaktion des Waschwassers gewaschen. Die Entfernung der Restfeuchte erfolgt durch Trocknung am Ölpumpenvakuum bzw. im evakuierten Exsikkator über Kaliumhydroxid.

Im folgenden werden neben den eingesetzten Mengen der jeweiligen Isatin- und Indoxylacetatderivaten, die Menge des Methanols und des Natriumcarbonats sowie die Vorgehensweise zur weiteren Aufreinigung und die Analysendaten angegeben.

6.2.1.1 1-Methylindirubin (25)

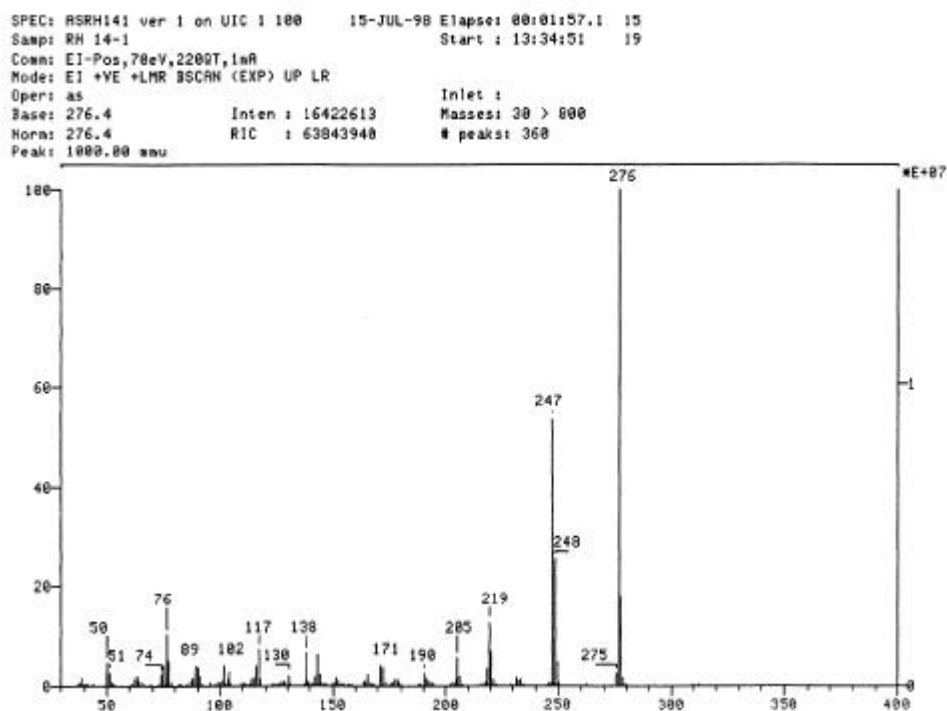


SYN, 200 mg (1,24 mmol) 1-Methylisatin (60), 217 mg (1,24 mmol) Indoxylacetat, 8 ml Methanol, 271 mg (2,56 mmol) Natriumcarbonat.

Das nach dem Waschen und Trocknen anfallende violette Pulver wird aus Pyridin umkristallisiert (120 mg auf 5 ml Pyridin), über Phosphorpentoxid getrocknet und bei 140 °C im Ölpumpenvakuum sublimiert. Es entstehen violette Substanzflocken sehr geringer Dichte.

| | |
|--------------------------|---|
| <u>Ausbeute:</u> | 195 mg, 0,706 mmol, 56,9 % |
| <u>Molekulargewicht:</u> | 276,32 g/mol |
| <u>Summenformel:</u> | $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ |
| <u>DC</u> (Kieselgel) | FM = n-Hexan / EE 2:3 $R_f = 0,88$ |
| <u>Elementaranalyse:</u> | Ber.: 73,9% C, 4,4 % H, 10,1 % N. Gef.: 73,6 % C, 4,3 % H, 10,1 % N. |

Massenspektrum (70eV)



$m/z = 277$ (18 %)

$m/z = 219$ ($\text{M}^+ - \text{CO} - \text{HCO}$ 13 %)

$m/z = 276$ (M^+ , 100 %)

 $m/z = 248$ ($M^+ - CO$, 25 %)

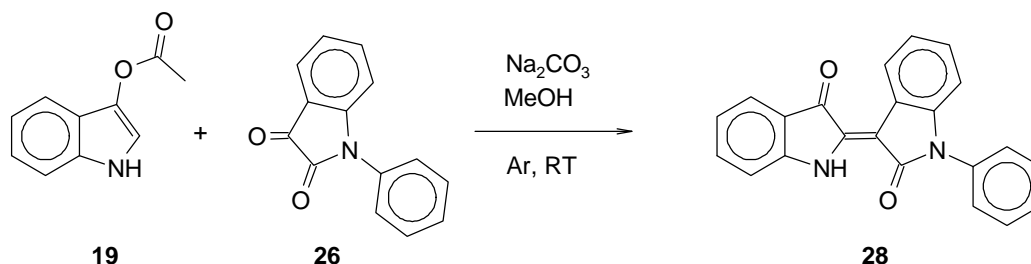
 $m/z = 247$ ($M^+ - HCO$, 54 %)

$m/z = 205$ ($M^+ - 2 CO - CH_3$, 6%)

 $m/z = 76$ (10 %)

1H -NMR-Spektrum: DMSO- d_6 , 200,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm),
 $\vartheta = 25^\circ C$

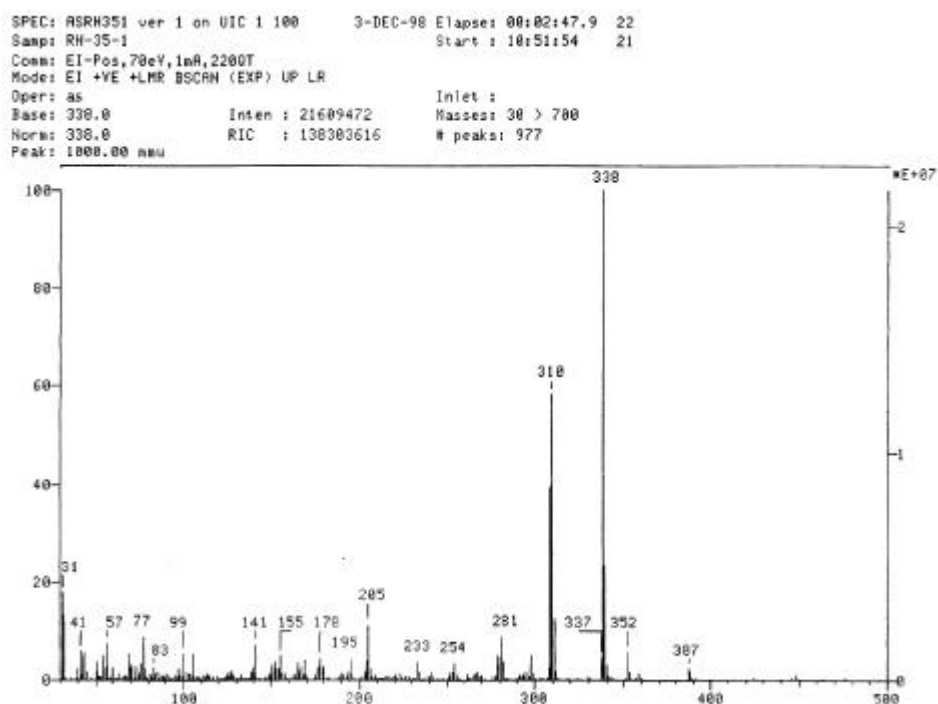
6.2.1.2 1-Phenylindirubin (28)



SYN, 500 mg (2,24 mmol) 1-Phenylisatin (**26**), 334 mg (1,90 mmol) Indoxylacetat, 20 ml Methanol, 430 mg (4,05 mmol) Natriumcarbonat. 1-Phenylindirubin (**28**) fällt als violettes Pulver an.

Ausbeute: 597 mg, 1,76 mmol, 92,6 %
Molekulargewicht: 338,37 g/mol
Summenformel: $C_{22}H_{14}N_2O_2$
DC (Kieselgel) FM = n-Hexan / EE 1/1
 $R_f = 0,92$
Elementaranalyse: Ber.: 78,1% C, 4,2 % H, 8,3 % N.
 Gef.: 77,8 % C, 4,2 % H, 8,1 % N

Massenspektrum (70eV)



$m/z = 338$ (M^+ , 100 %)

 $m/z = 311$ (13 %)

 $m/z = 310$ ($M^+ - CO$, 58 %)

 $m/z = 309$ ($M^+ - HCO$, 39 %)

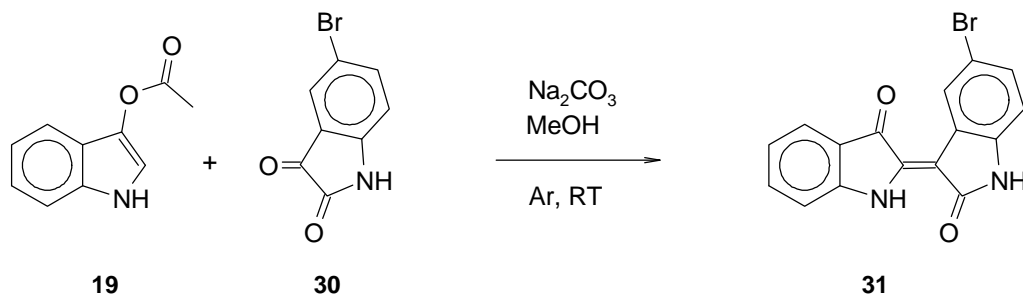
 $m/z = 233$ (4 %)

 $m/z = 205$ (11 %)

 $m/z = 77$ (9 %)

1H -NMR-Spektrum: DMSO- d_6 , 200,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm),
 $\vartheta = 25^\circ C$

^{13}C -NMR-Spektrum: DMSO- d_6 , 100,61 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm),

$\vartheta = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ **6.2.1.3 5-Bromindirubin (31)**

SYN, 1,30 g (5,75 mmol) 5-Bromisatin (**30**), 1,00 g (5,71 mmol) Indoxylacetat, 20 ml + 5 ml Methanol, 1,30 mg (12,3 mmol) Natriumcarbonat.

Das nach dem Waschen und Trocknen anfallende schwarze Pulver wird aus Pyridin umkristallisiert (500 mg auf 20 ml Pyridin). Dabei kristallisiert 5-Bromindirubin (**31**) in dicken, dunkelvioletten Kristallklumpen. Nach zweitägiger Lagerung im evakuierten Exsikkator über Phosphorpentoxid entfernt man das im Kristallverband eingeschlossene Pyridin bei 140 °C am Ölpumpenvakuum und erhält schwarze Kristalle mit rotviolettem Schimmer.

Ausbeute: 1,16 g, 3,39 mmol, 59,3 %

Molekulargewicht: 341,16 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{BrN}_2\text{O}_2$

DC (Kieselgel) FM = n-Hexan / EE 1:1

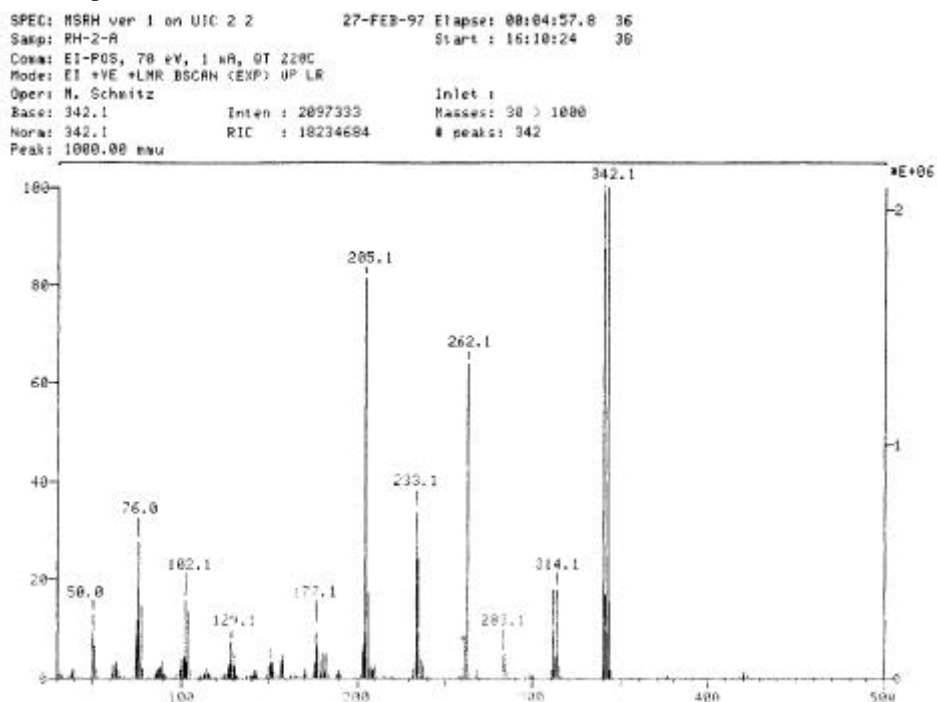
$R_f = 0,49$

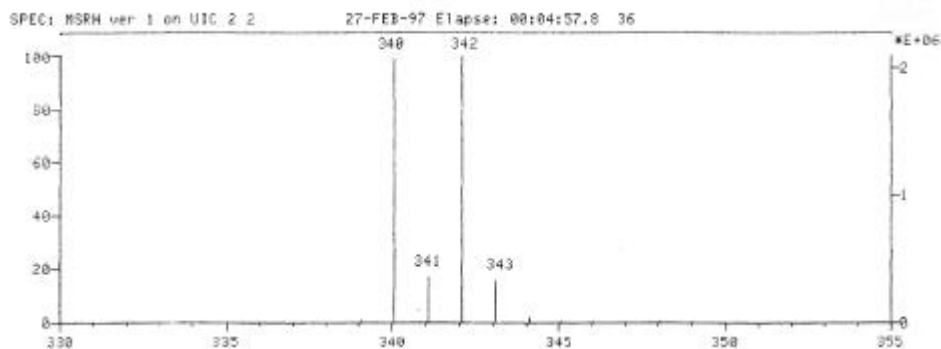
Elementaranalyse (vor Entfernen des Pyridins) Ber. ($1/2$ Pyridin): 58,4% C, 3,0 % H, 9,2 % N.

Gef.: 58,6 % C, 3,1 % H, 9,0 % N.

Elementaranalyse: Ber.: 56,3% C, 2,7 % H, 8,2 % N.

Gef.: 56,4 % C, 2,7 % H, 8,2 % N.

Massenspektrum (70eV)

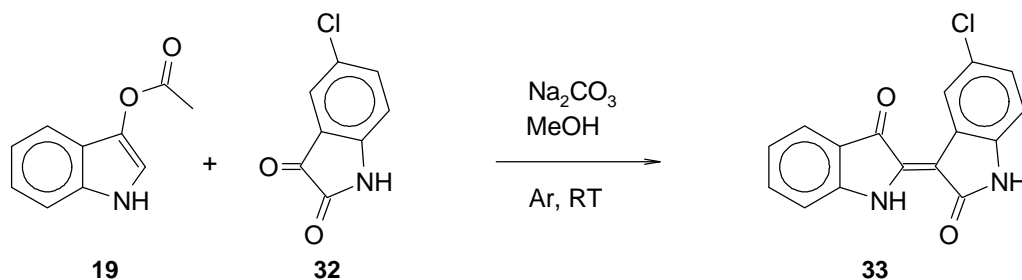


| | |
|---------------------------------------|------------------|
| m/z = 342 (M ⁺ , 100 %) | m/z = 206 (17 %) |
| m/z = 340 (M ⁺ , 99 %) | m/z = 205 (81 %) |
| m/z = 314 (M ⁺ - CO, 18 %) | m/z = 104 (14 %) |
| m/z = 312 (M ⁺ - CO, 18 %) | m/z = 103 (11 %) |
| m/z = 263 (10 %) | m/z = 102 (16 %) |
| m/z = 262 (64 %) | m/z = 77 (15 %) |
| m/z = 261 (M ⁺ - Br, 7 %) | m/z = 76 (27 %) |
| m/z = 234 (24 %) | m/z = 75 (15 %) |
| m/z = 233 (34 %) | m/z = 50 (13 %) |

¹H-NMR-Spektrum: DMSO-d₆, 400,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm),
 ϑ = 25 °C

¹³C-NMR-Spektrum: DMSO-d₆, 100,61 MHz; DMSO-d₅ als Standard (39,70 ppm),
 ϑ = 25 °C

6.2.1.4 5-Chlorindirubin (32)



SYN, 500 mg (2,75 mmol) 5-Chlorisatin (32), 480 mg (2,73 mmol) Indoxylacetat, 10 ml + 5 ml Methanol, 620 mg (5,89 mmol) Natriumcarbonat.

5-Chlorindirubin (33) liegt als violette Pulver vor.

Ausbeute: 766 mg 2,58 mmol, 94,6 %

Molekulargewicht: 296,70 g/mol

Summenformel: C₁₆H₉ClN₂O₂

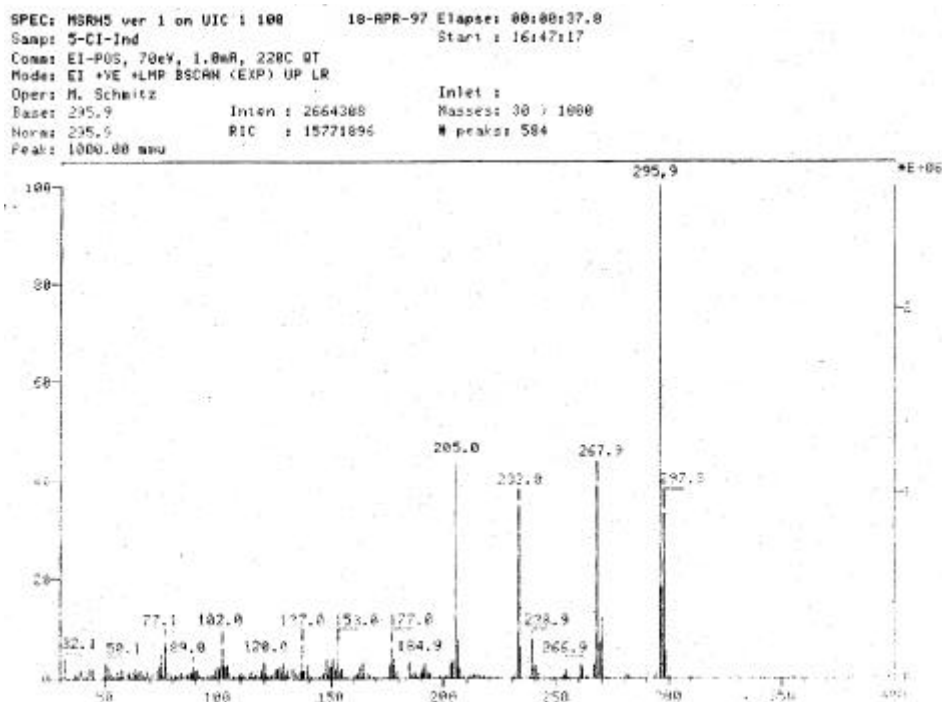
DC (Kieselgel) FM = n-Hexan / EE 1:1

R_f = 0,60

Elementaranalyse: Ber.: 64,8% C, 3,1 % H, 9,4 % N.

Gef.: 64,5 % C, 3,0 % H, 9,5 % N.

Massenspektrum (70eV)

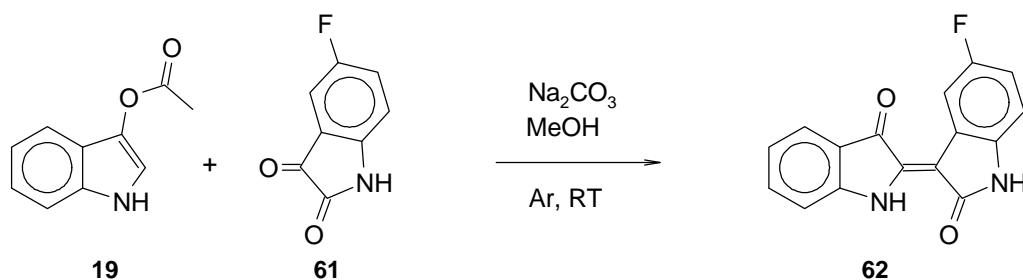


| | |
|---------------------------------------|--------------------|
| $m/z = 296 (M^+, 100 \%)$ | $m/z = 153 (6 \%)$ |
| $m/z = 268 (M^+ - CO, 39 \%)$ | $m/z = 137 (7 \%)$ |
| $m/z = 239 (8 \%)$ | $m/z = 120 (4 \%)$ |
| $m/z = 233 (M^+ - CO - Cl, 35 \%)$ | $m/z = 102 (6 \%)$ |
| $m/z = 205 (M^+ - 2x CO - Cl, 50 \%)$ | $m/z = 77 (7 \%)$ |
| $m/z = 177 (7 \%)$ | |

$^1\text{H-NMR-Spektrum}$: DMSO- d_6 , 400,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm),
 $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

$^{13}\text{C-NMR-Spektrum}$: DMSO- d_6 , 100,61 MHz; DMSO- d_5 als Standard (39,70 ppm),
 $\vartheta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

6.2.1.5 5-Fluorindirubin (62)



SYN, 500 mg (3,03 mmol) 5-Fluorindol-3-carboxamid (**61**), 530 mg (3,00 mmol) Indoxylacetat, 10 ml + 5 ml Methanol, 680 mg (6,45 mmol) Natriumcarbonat.

5-Fluorindirubin (**62**) liegt als violette Pulver vor.

Ausbeute: 776 mg, 2,77 mmol, 92,4 %

Molekulargewicht: 280,25 g/mol

Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{FN}_2\text{O}_2$

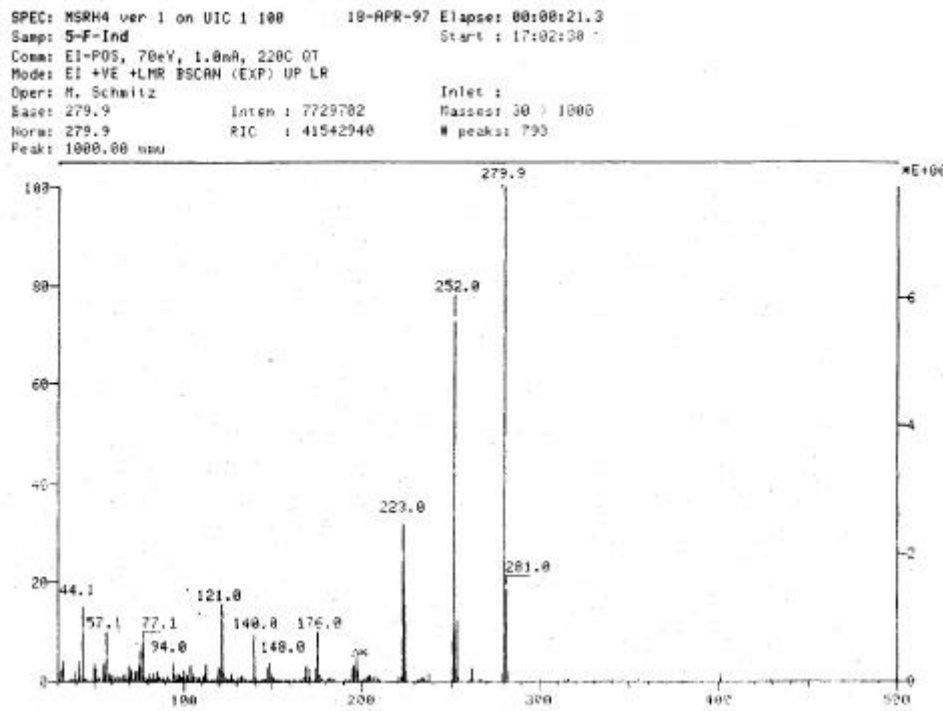
DC (Kieselgel) FM = n-Hexan / EE 2:1

$R_f = 0,32$

Elementaranalyse: Ber.: 68,6% C, 3,2 % H, 9,9 % N.

Gef.: 68,0 % C, 3,2 % H, 9,9 % N.

Massenspektrum (70eV)

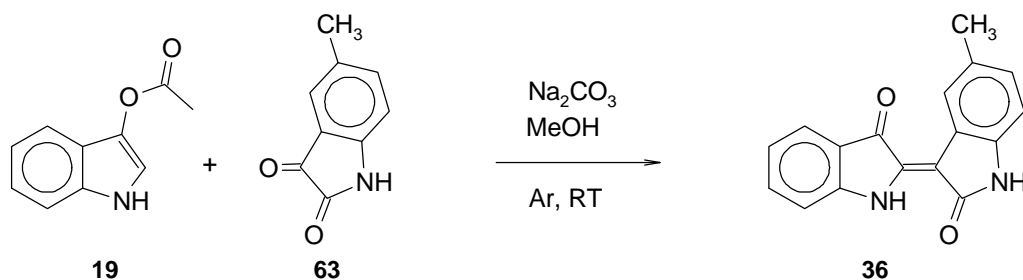


| | |
|--|------------------|
| m/z = 281 (19 %) | m/z = 140 (7 %) |
| m/z = 280 (M ⁺ , 100 %) | m/z = 121 (13 %) |
| m/z = 252 (M ⁺ - CO, 73 %) | m/z = 94 (4 %) |
| m/z = 223 (M ⁺ - 2x CO, 32 %) | m/z = 77 (7 %) |
| m/z = 176 (6 %) | m/z = 57 (4 %) |

¹H-NMR-Spektrum: DMSO-d₆, 400,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm),
 ϑ = 25 °C

¹³C-NMR-Spektrum: DMSO-d₆, 100,61 MHz; DMSO-d₅ als Standard (39,70 ppm),
 ϑ = 25 °C

6.2.1.6 5-Methylindirubin (36)



SYN, 500 mg (3,10 mmol) 5-Methylisatin (**63**), 540 mg (3,07 mmol) Indoxylacetat, 10 ml + 5 ml Methanol 700 mg (6,61 mmol) Natriumcarbonat.

5-Methylindirubin liegt als violettes Pulver vor.

Ausbeute: 781 mg, 2,83 mmol, 92,0 %

Molekulargewicht: 276,28 g/mol

Summenformel: C₁₇H₁₂N₂O₂

DC (Kieselgel) FM = n-Hexan / EE 2:1

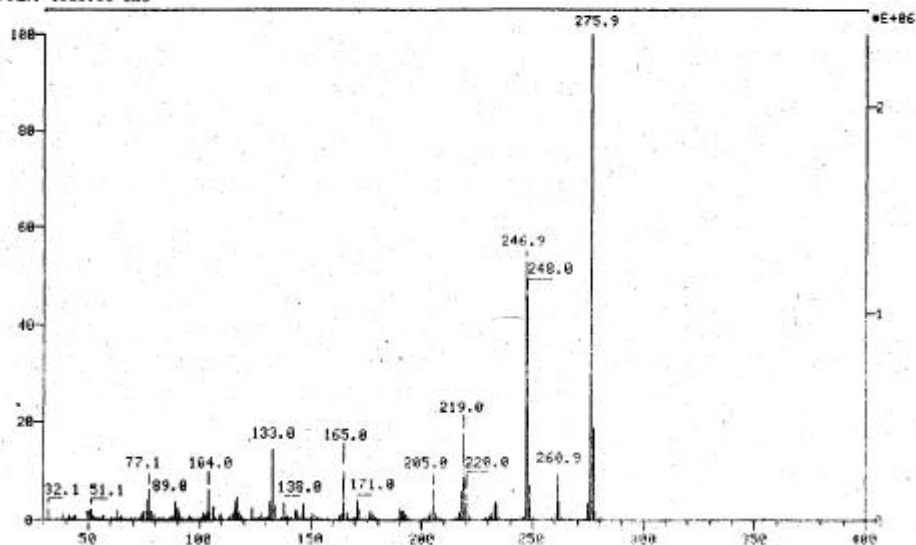
R_f = 0,44

Elementaranalyse: Ber.: 73,9% C, 4,4 % H, 10,1 % N.

Gef.: 73,8 % C, 4,3 % H, 10,2 % N.

Massenspektrum (70eV)

SPEC: MSRM2 ver 1 on UIC 1 100 10-APR-97 Elapse: 00:00:46.7
 Samp: 5-Ne-Ind* Start: 17:21:52
 Coma: EI-POS, 70eV, 1.0uA, 220C OT
 Mode: EI +VE +LMR ESCAN (EXP) UP LR
 Oper: M. Schmitz Inlet:
 Base: 275.9 Inten: 2352927 Masse: 30 > 1000
 Norm: 275.9 RIC: 11568954 # peak: 509
 Peak: 1000.00 m/z

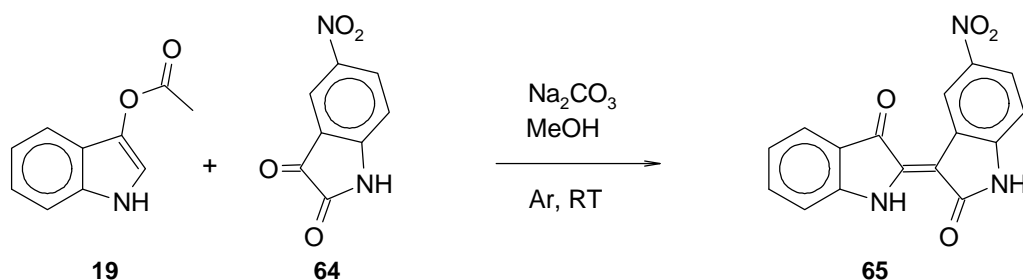


| | |
|------------------------------------|--------------------|
| $m/z = 276$ (M^+ , 100 %) | $m/z = 171$ (4 %) |
| $m/z = 261$ ($M^+ - CH_3$, 10 %) | $m/z = 165$ (10 %) |
| $m/z = 248$ ($M^+ - CO$, 47 %) | $m/z = 138$ (4 %) |
| $m/z = 247$ ($M^+ - CHO$, 53 %) | $m/z = 133$ (15 %) |
| $m/z = 220$ (6 %) | $m/z = 104$ (7 %) |
| $m/z = 219$ (18 %) | $m/z = 77$ (7 %) |
| $m/z = 205$ (7 %) | |

1H -NMR-Spektrum: DMSO- d_6 , 400,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm),
 $\vartheta = 25^\circ C$

^{13}C -NMR-Spektrum: DMSO- d_6 , 100,61 MHz; DMSO- d_5 als Standard (39,70 ppm),
 $\vartheta = 25^\circ C$

6.2.1.7 5-Nitroindirubin (65)



SYN, 1000 mg (5,20 mmol) 5-Nitroisatin (**64**) 900 mg (5,14 mmol) Indoxylacetat, 20 ml + 5 ml Methanol, 1170 mg (11,1 mmol) Natriumcarbonat.

5-Nitroindirubin (**65**) liegt als violettes Pulver vor.

Ausbeute: 1,39 g, 4,52 mmol, 88,2 %

Molekulargewicht: 307,26 g/mol

Summenformel: $C_{16}H_9N_3O_4$

DC (Kieselgel) FM = n-Hexan / EE 2:1

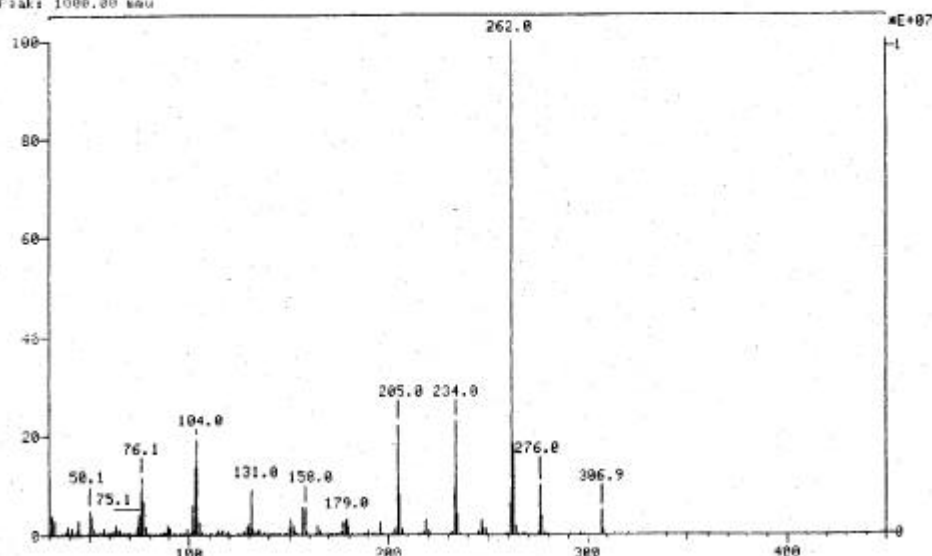
$R_f = 0,16$

Elementaranalyse: Ber.: 62,5% C, 3,0 % H, 13,7 % N.

Gef.: 62,4 % C, 3,0 % H, 13,3 % N.

Massenspektrum (70eV)

SPEC: MSFH3 ver 1 on UIC 1 100 0-APR-97 Elase: 00:03:06.0
 Samp: 5-H02-Ind Start: 17:14:49
 C:ms: EI-POS, 70eV, 1.0uA, 220C OT
 M:de: EI +VE +LMR BSCAN (EXP) UP LR
 Coe: M. Schwitz Inlet:
 F:ax: 202.0 Inten: 10137534 Masseu: 30 > 1000
 M:ret: 262.0 RIC: 44126860 # peaks: 778
 Pa:ak: 1000.00 mau

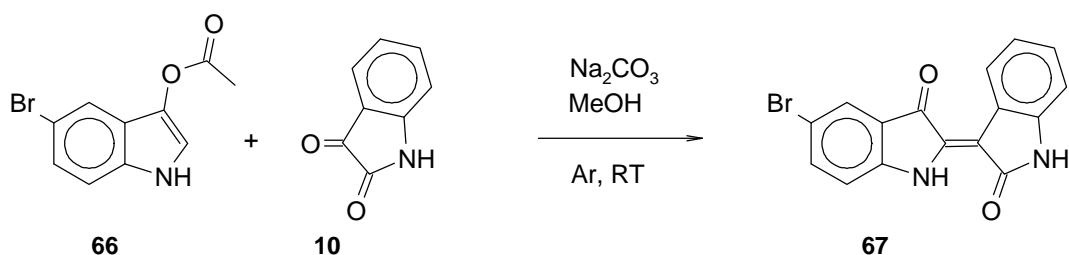


| | |
|---|--------------------|
| $m/z = 307$ (M^+ , 5 %) | $m/z = 158$ (6 %) |
| $m/z = 276$ ($M^+ - NO$, 10 %) | $m/z = 131$ (10 %) |
| $m/z = 262$ ($M^+ - NO_2$, 100 %) | $m/z = 104$ (19 %) |
| $m/z = 234$ ($M^+ - NO_2 - CO$, 23 %) | $m/z = 76$ (12 %) |
| $m/z = 205$ (22 %) | $m/z = 50$ (6 %) |

1H -NMR-Spektrum: DMSO- d_6 , 400,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm),
 $\vartheta = 25\text{ }^\circ\text{C}$

^{13}C -NMR-Spektrum: DMSO- d_6 , 100,61 MHz; DMSO- d_5 als Standard (39,70 ppm),
 $\vartheta = 25\text{ }^\circ\text{C}$

6.2.1.8 5'-Bromindirubin (67)



SYN, 59 mg (0,40 mmol) Isatin, 100 mg (0,394 mmol) 5-Bromindoxylacetat (**66**), 4 ml + 1 ml Methanol, 91 mg (0,86 mmol) Natriumcarbonat. 5'-Bromindirubin (**67**) liegt als violettes Pulver vor.

Ausbeute: 123 mg, 0,361 mmol, 92,6 %

Molekulargewicht: 341,16 g/mol

Summenformel: $C_{16}H_9BrN_2O_2$

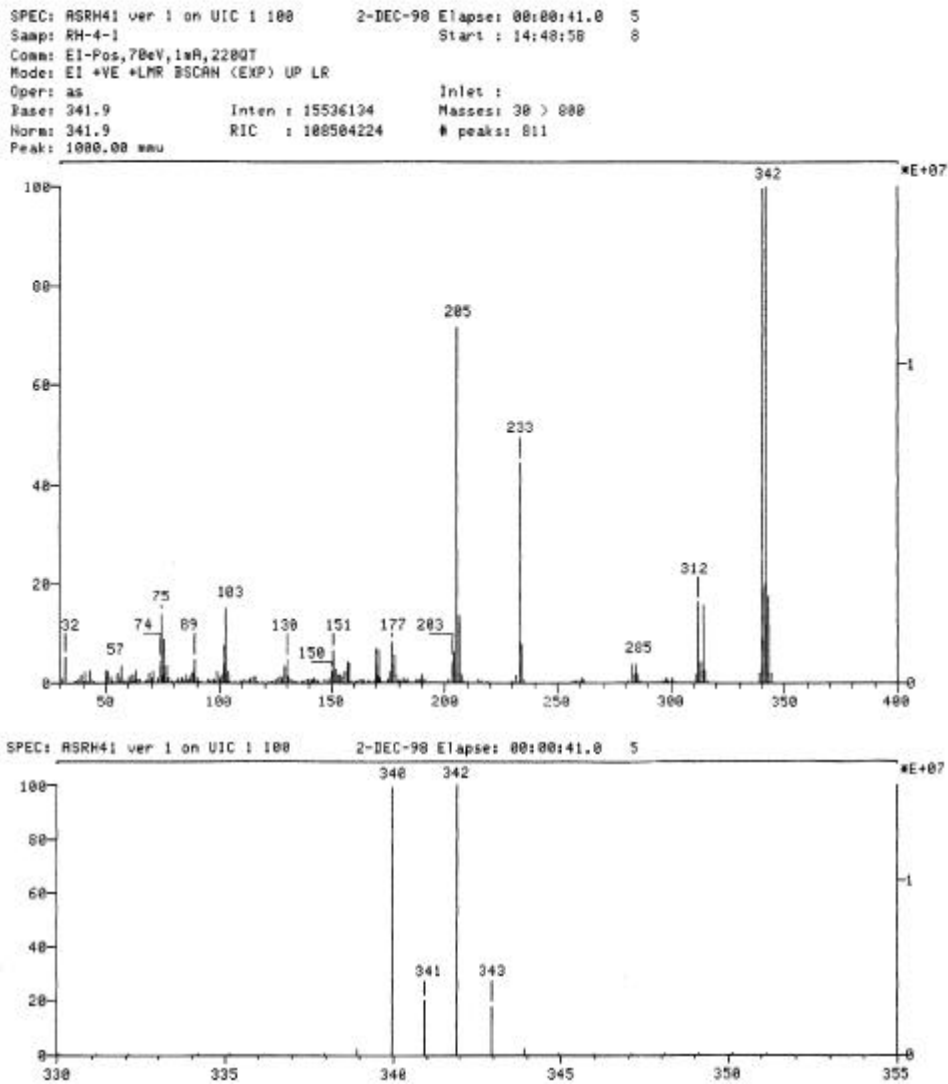
DC (Kieselgel) FM = n-Hexan / EE 1:1

$R_f = 0,59$

Elementaranalyse: Ber.: 56,3 % C, 2,7 % H, 8,2 % N.

Gef.: 55,7 % C, 2,5 % H, 8,0 % N.

Massenspektrum (70eV)



$m/z = 342$ (M^+ , 100 %)

$m/z = 340$ (M^+ , 100 %)

$m/z = 314$ ($M^+ - CO$, 16 %)

$m/z = 312$ ($M^+ - CO$, 16 %)

$m/z = 261$ ($M^+ - Br$, 1 %)

$m/z = 233$ ($M^+ - Br - CO$, 44 %)

$m/z = 206$ (14 %)

$m/z = 205$ ($M^+ - Br - 2 CO$, 71 %)

$m/z = 103$ (15 %)

$m/z = 75$ (14 %)

1H -NMR-Spektrum:

DMSO- d_6 , 400,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm),

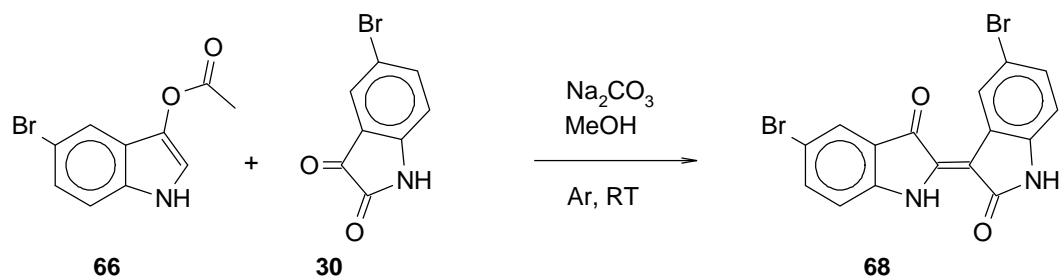
$\vartheta = 25$ °C

^{13}C -NMR-Spektrum:

DMSO- d_6 , 100,61 MHz; DMSO- d_5 als Standard (39,70 ppm),

$\vartheta = 25$ °C

6.2.1.9 5,5'-Dibromindirubin (68)



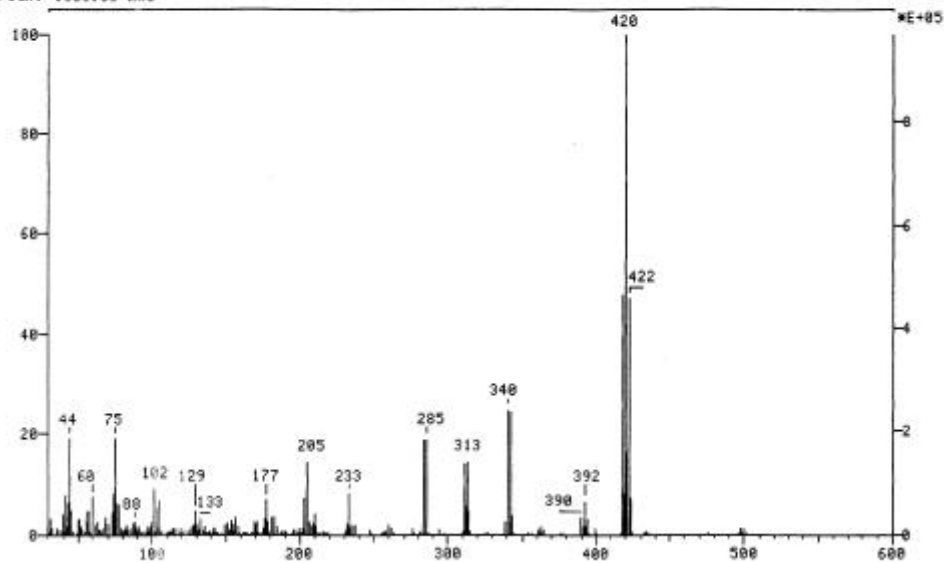
SYN, 89 mg (0,39 mmol) 5-Bromisatin (**30**), 100 mg (0,394 mmol) 5-Bromindoxylacetat (**66**), 4 ml + 1 ml Methanol, 91 mg (0,86 mmol) Natriumcarbonat.

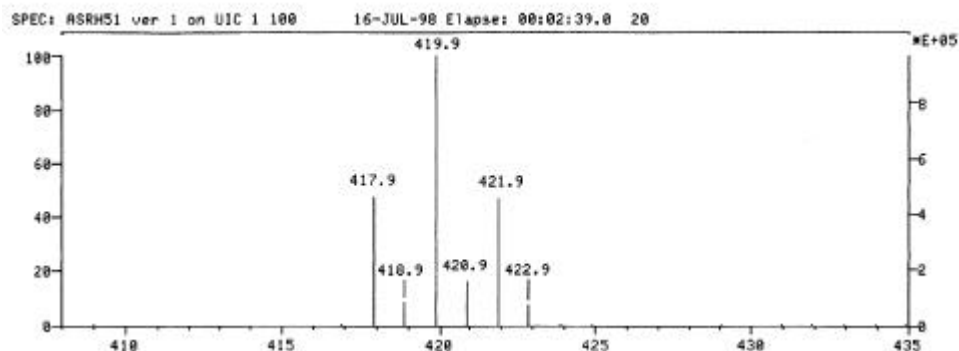
5,5'-Dibromindirubin (**68**) liegt als violettes Pulver vor.

Ausbeute: 154 mg, 0,367 mmol, 94,0 %
Molekulargewicht: 420,06 g/mol
Summenformel: C₁₆H₈Br₂N₂O₂
Elementaranalyse: Ber.: 45,7 % C, 1,9 % H, 6,7 % N.
 Gef.: 45,8 % C, 2,0 % H, 6,4 % N.

Massenspektrum (70eV)

SPEC: ASRM51 ver 1 on UIC 1 100 16-JUL-98 Elapse: 00:02:39.0 20
 Samp: RH-5-1 Start: 13:39:55 21
 Com: E1-Pos, 70eV, 2200T, 1mA
 Mode: EI +VE +LMR BSCAN (EXP) UP LR
 Oper: as Inlet:
 Base: 419.9 Inten: 970102 Masses: 30 > 800
 Norm: 419.9 RIC: 7002546 # peaks: 472
 Peak: 1000.00 m/z





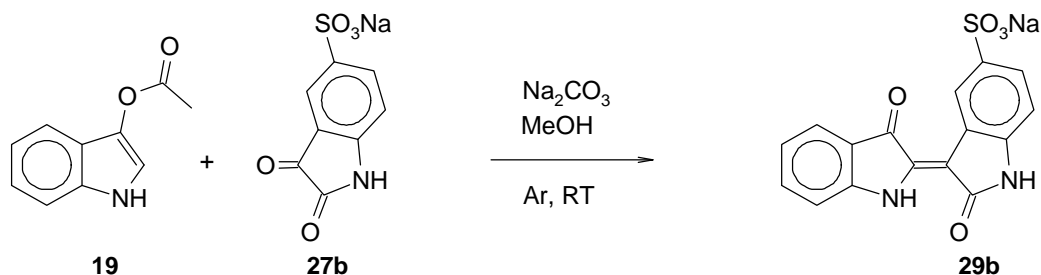
m/z = 422 (M^+ , 47 %)
 m/z = 420 (M^+ , 100 %)
 m/z = 418 (M^+ , 48 %)
 m/z = 394 (M^+ - CO, 3 %)
 m/z = 392 (M^+ - CO, 7 %)
 m/z = 390 (M^+ - CO, 3 %)
 m/z = 342 (25 %)
 m/z = 340 (25 %)

m/z = 313 (M^+ - CO - Br, 15 %)
 m/z = 311 (M^+ - CO - Br, 15 %)
 m/z = 285 (M^+ - 2 CO - Br, 19 %)
 m/z = 232 (M^+ - 2 Br - CO, 2 %)
 m/z = 205 (15 %)
 m/z = 75 (19 %)
 m/z = 44 (19 %)

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum:

DMSO- d_6 , 400,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm),
 $\vartheta = 25\text{ }^\circ\text{C}$

6.2.1.10 Indirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (29b)

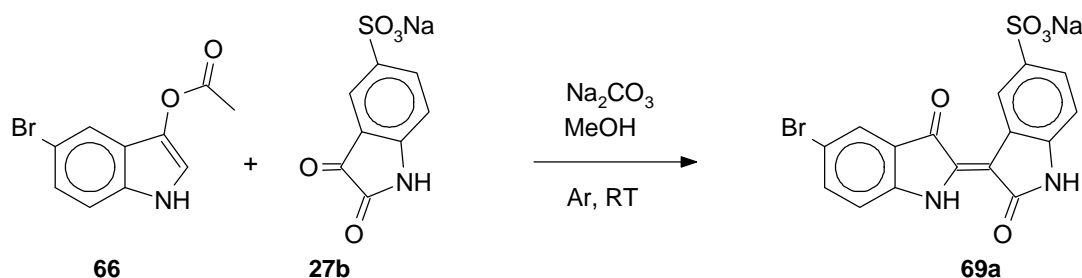


SYN, 250 mg (1,00 mmol) Isatin-5-sulfonsäure (Natriumsalz), 170 mg (0,971 mmol) Indoxylacetat, 10 ml + 5 ml Methanol, 230 mg (2,14 mmol) Natriumcarbonat.

Das Natriumsalz der Indirubin-5-sulfonsäure (**29b**) liegt als violetter Kristallkuchen vor.

Ausbeute: 258 mg, 0,708 mmol, 70,8 %
Molekulargewicht: 364,30 g/mol (mit 1,5 H_2O : 391,32 g/mol)
Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{N}_2\text{NaO}_5\text{S}$
DC (Kieselgel) FM = Ethanol
 $R_f = 0,73$
Elementaranalyse: Ber. (1,5 H_2O): 49,1% C, 3,1 % H, 7,2 % N.
 Gef.: 49,2 % C, 3,1 % H, 7,2 % N.
 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum: DMSO- d_6 , 400,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm),
 $\vartheta = 25\text{ }^\circ\text{C}$
 $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum: DMSO- d_6 , 100,61 MHz; DMSO- d_5 als Standard (39,70 ppm),
 $\vartheta = 25\text{ }^\circ\text{C}$

6.2.1.11 5'-Bromindirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz, Dihydrat) (69a)

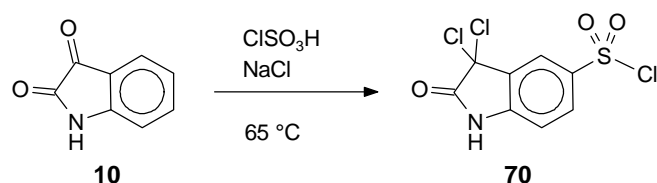


SYN, 224 mg (0,787 mmol) Isatin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) Dihydrat, 200 mg (0,787 mmol) 5-Bromindoxylacetat (**66**), 3 ml Methanol, 178 mg (1,68 mmol) Natriumcarbonat.

Das Natriumsalz der 5'-Bromindirubin-5-sulfonsäure (**69a**) liegt als violetteres Pulver vor.

| | |
|------------------------------------|--|
| <u>Ausbeute:</u> | 204 mg, 0,460 mmol, 58,5 % |
| <u>Molekulargewicht:</u> | 443,21 g/mol (mit 2 H ₂ O: 479,24 g/mol) |
| <u>Summenformel:</u> | C ₁₆ H ₈ BrN ₂ NaO ₅ S |
| <u>Elementaranalyse:</u> | Ber. (2 H ₂ O): 40,1% C, 2,5 % H, 5,9 % N. Gef.: 39,6 % C, 2,4 % H, 5,7 % N. |
| <u>¹H-NMR-Spektrum:</u> | DMSO-d ₆ , 400,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm), ϑ = 25 °C |

6.2.1.12 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonylchlorid (70)

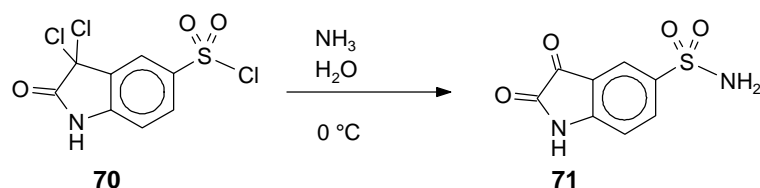


Die Reaktion wird nach Haller (1938 a) durchgeführt. In 10 ml (17,5 g, 150 mmol) Chlorsulfonsäure wird unter Rühren 2,00 g (13,6 mmol) Isatin portionsweise eingetragen. Die entstehende dunkelbraune Lösung wird für eine Stunde bei 65 °C gehalten. Dann wird portionsweise bei 60 – 65 °C über einen Zeitraum von 2 Stunden unter Rühren 0,70 g (12 mmol) Natriumchlorid eingetragen. Bei jeder Portion schäumt das Reaktionsgemisch heftigst auf.

Die Reaktionsmischung wird auf Eis gegossen, dabei scheidet sich ein gelbliche, gummiartige Masse ab. Man filtriert über eine Glasfritte (3) und trocknet im evakuierten Exsikkator über Phosphorpentoxid. Durch Mörsern der beim Trocknen hart und spröde gewordenen Substanz erhält man ein ocker-gelbes Pulver, das so für weitere Umsetzungen eingesetzt werden kann.

| | |
|--------------------------|---|
| <u>Ausbeute:</u> | 3,30 g, 11,0 mmol, 80,7 % |
| <u>Molekulargewicht:</u> | 300,55 g/mol |
| <u>Summenformel:</u> | C ₈ H ₄ Cl ₃ N ₂ O ₃ S |
| <u>DC (Kieselgel)</u> | FM = n-Hexan / EE 1:1 R _f = 0,66 |

6.2.1.13 Isatin-5-sulfonamid (71)



5,0 ml auf 0 °C gekühlte 25 %ige Ammoniaklösung wird unter heftigem Rühren portionsweise vorsichtig mit 0,50 g (1,7 mmol) 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonylchlorid versetzt. Die sich bildende rote

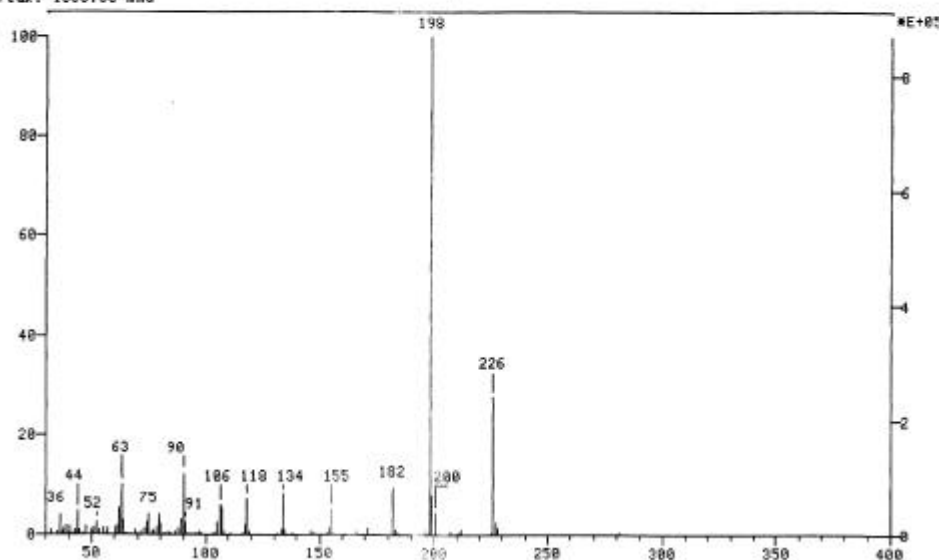
Lösung läßt man 2 Stunden unter Eiskühlung weiter rühren. Dann gibt man 3 g zerstoßenes Eis hinzu und soviel 20 %ige Salzsäure, daß das Reaktionsgemisch sauer reagiert. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abgezogen und der zurückbleibende orangefarbene Feststoff im evakuierten Exsikkator über KOH getrocknet. Das gelbe Pulver wird mit 3 mal je 35 ml Aceton extrahiert und das Aceton am Rotationsverdampfer entfernt. Das so erhaltene, als orangefarbenes Pulver vorliegende Isatin-5-sulfonamid (**71**) wird in dieser Reinheitsstufe für die weitere Umsetzung eingesetzt.

Ausbeute: 140 mg, 0,619 mmol 36,4 %
Molekulargewicht: 226,21 g/mol
Summenformel: $C_8H_6N_2O_4S$
DC (Kieselgel) FM = EE

$R_f = 0,73$

Massenspektrum (70eV)

SPEC: RSRH93 ver 1 on UIC : 100 1-JUL-98 Elapse: 00:04:40.3 36
 Sasp: RH 99 3 Start : 17:20:11 29
 Conn: EI-pos,70eV,1.8mA,QT==220
 Mode: EI +VE +LMR BSCAN (EXP) UP LR
 Oper: as Inlet :
 Base: 198.1 Inten : 870027 Masses: 30 > 800
 Norm: 198.1 RIC : 2648988 # peaks: 205
 Peak: 1000.00 m/z

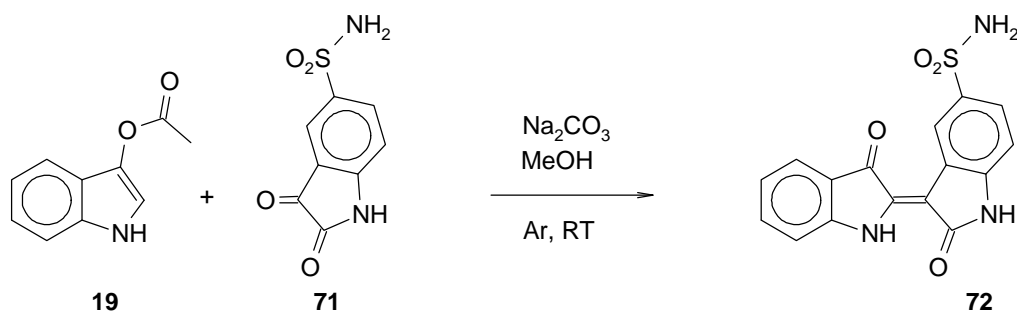


| | |
|--|--|
| $m/z = 226$ (M^+ , 28 %) | $m/z = 118$ (7 %) |
| $m/z = 200$ (4 %) | $m/z = 106$ (6%) |
| $m/z = 198$ ($M^* - CO$, 100 %) | $m/z = 90$ ($M^+ - 2 CO - H_2NSO_2^+$, 12 %) |
| $m/z = 182$ (9%) | $m/z = 80$ ($H_2NSO_2^+$, 2%) |
| $m/z = 155$ ($M^+ - CO - HNCO$, 5 %) | $m/z = 75$ (4 %) |
| $m/z = 134$ (8%) | $m/z = 63$ (10 %) |

1H -NMR-Spektrum: DMSO- d_6 , 400,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm),
 $\vartheta = 25^\circ C$

^{13}C -NMR-Spektrum: DMSO- d_6 , 100,61 MHz; DMSO- d_5 als Standard (39,70 ppm),
 $\vartheta = 25^\circ C$

6.2.1.14 Indirubin-5-sulfonamid (72)

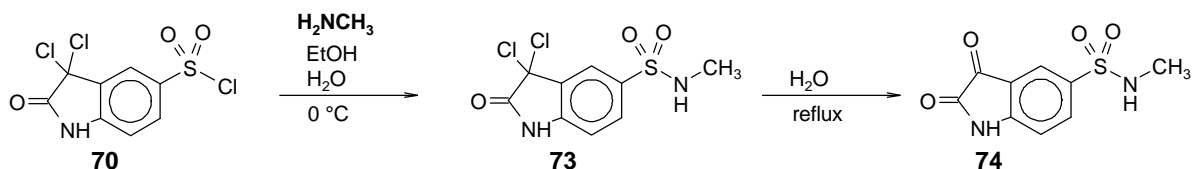


SYN, 120 mg (0,530 mmol) Isatin-5-sulfonamid (**71**), 79 mg (0,045 mmol) Indoxylacetat (**19**), 3 ml Methanol, 110 mg (1,04 mmol) Natriumcarbonat.

Das mit Indigo verunreinigte Rohprodukt (79 mg) wird in 50 ml Aceton gelöst, an 1,6 g Kieselgel adsorbiert und an 20 g Kieselgel säulenchromatographisch aufgereinigt. Als Fließmittel dient bis zur Elution von Indigo ein n-Hexan/EE-(1:1)-Gemisch und dann EE. Indirubin-5-sulfonamid (**72**) fällt nach Entfernen des Lösungsmittels und nach Trocknung als schwarzes Pulver an, das noch mit 8 Massen-% Indigo verunreinigt ist ($^1\text{H-NMR}$).

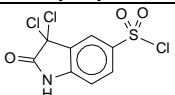
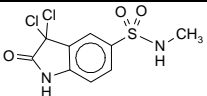
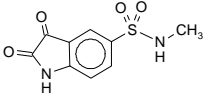
| | |
|---|--|
| <u>Ausbeute:</u> | 8 mg, 0,02 mmol, 5 % |
| <u>Molekulargewicht:</u> | 341,35 g/mol |
| <u>Summenformel:</u> | $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ |
| <u>DC (Kieselgel)</u> | FM = EE $R_f = 0,79$ |
| <u>$^1\text{H-NMR}$-Spektrum:</u> | DMSO-d_6 , 400,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm), $\vartheta = 50^\circ\text{C}$ |
| <u>$^{13}\text{C-NMR}$-Spektrum:</u> | DMSO-d_6 , 100,61 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm), $\vartheta = 50^\circ\text{C}$ |

6.2.1.15 Isatin-5-sulfonsäuremethyamid (74)



572 μl 40 %ige wäßrige Methylaminlösung ($\rho = 0,899 \text{ g/cm}^3$) (entspricht 6,62 mmol Methylamin) werden in 5,6 ml Ethanol gelöst und die Lösung auf 0°C gekühlt. Dazu wird unter intensivem Rühren und weiterem Kühlen portionsweise 1,00 g (3,34 mmol) 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonylchlorid zugegeben. Nach 15 min wird die Eiskühlung entfernt und bei Raumtemperatur eine Stunde weiter gerührt. Falls auf der DC noch ein Eduktfleck ($R_f = 0,66$) zu sehen ist, gibt man zusätzliche 2-3 Tropfen 40 %ige wäßrige Methylaminlösung zum Reaktionsgemisch und rührt weiter. Nach vollständigem Abreagieren des 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonylchlorids gibt man 10 g zerstoßenes Eis und 1000 μl 20 %ige Salzsäure hinzu und lagert 12 Stunden bei -20°C .

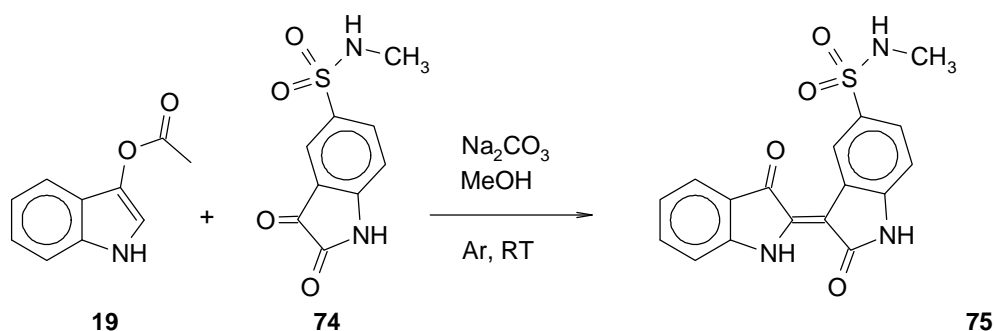
Die über dem ausgefallenen Feststoff (3,3-Dichloroxindol-5-sulfonsäuremethyamid) stehende Lösung wird abpipettiert, und der Feststoff in 20 ml Wasser unter Rückfluß zum Sieden erhitzt, bis in der entstehenden orangefarbenen Lösung per DC kein 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonsäuremethyamid ($R_f = 0,28$) mehr nachgewiesen werden kann.

| DC (Kieselgel), FM = n-Hexan / EE (1:1) | | R _f |
|--|---|----------------|
| 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonylchlorid (70) |  | 0,66 |
| 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonsäuremethylamid (73) |  | 0,28 |
| Isatin-5-sulfonsäuremethylamid (74) |  | 0,09 |

Nach 1-2 tägiger Lagerung bei 4 °C fällt Isatin-5-sulfonsäuremethylamid (**74**) in Form von gelben Kristallen aus. Der Überstand wird abpipettiert, die Trocknung erfolgt im evakuierten Exsikkator über KOH.

| | |
|------------------------------------|---|
| <u>Ausbeute:</u> | 420 mg, 1,75 mmol, 52,3 % |
| <u>Molekulargewicht:</u> | 240,24 g/mol |
| <u>Summenformel:</u> | C ₉ H ₈ N ₂ O ₄ S |
| <u>DC</u> (Kieselgel) | FM = n-Hexan / EE 1:2 R _f = 0,29 |
| <u>¹H-NMR-Spektrum:</u> | DMSO-d ₆ , 400,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm), ϑ = 25 °C |

6.2.1.16 Indirubin-5-sulfonsäuremethylamid (**75**)

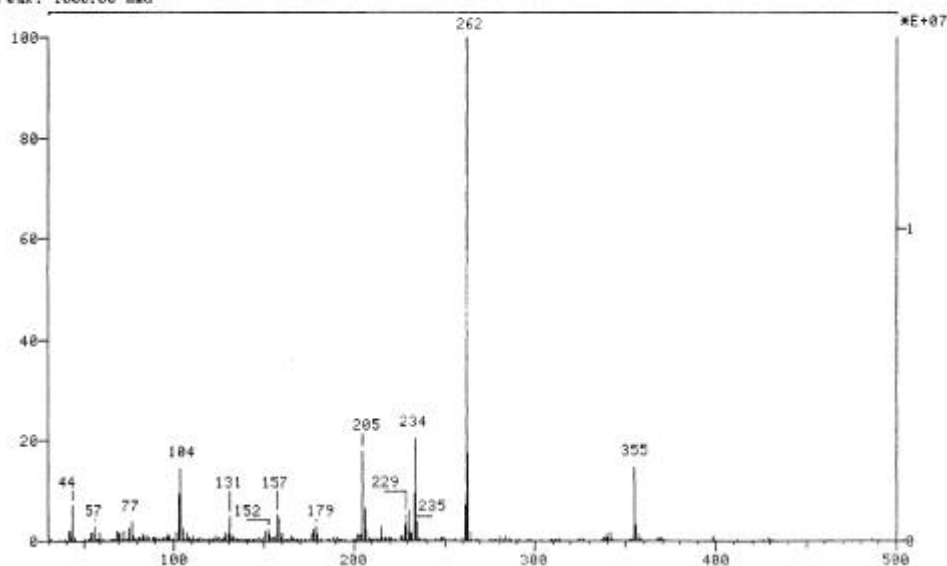


SYN, 380 mg (1,58 mmol) Isatin-5-sulfonsäuremethylamid (**74**), 227 mg (1,30 mmol) Indoxylacetat, 8 ml Methanol, 319 mg (3,01 mmol) Natriumcarbonat.

Indirubin-5-sulfonsäuremethylamid (**75**) fällt als violette Pulver an.

| | |
|------------------------------|---|
| <u>Ausbeute:</u> | 370 mg, 1,04 mmol, 80,1 % |
| <u>Molekulargewicht:</u> | 355,37 g/mol |
| <u>Summenformel:</u> | C ₁₇ H ₁₃ N ₃ O ₄ S |
| <u>DC</u> (Kieselgel) | FM = EE R _f = 0,72 |
| <u>Massenspektrum</u> (70eV) | |

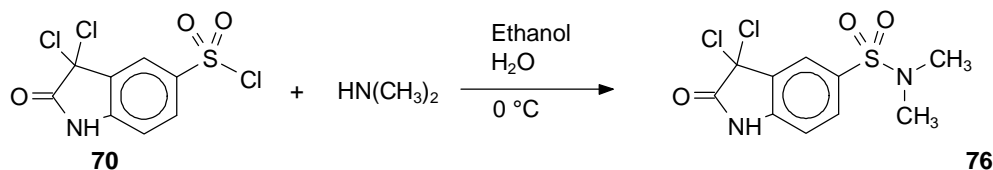
SPEC: ASRH321 ver 1 on UIC 1 100 3-DEC-98 Elapse: 00:04:42.7 38
 Samp: RH-32-1 Start: 10:59:04 55
 Com: EI-Pos, 70eV, 1mA, 2200T
 Mode: EI +VE +LMR BSCAN (EXP) UP LR
 Oper: as Inlet :
 Base: 262.0 Inten: 16186301 Masses: 30 > 700
 Norm: 262.8 RIC: 67139424 # peaks: 856
 Peak: 1000.00 mau



| | |
|--|--------------------|
| $m/z = 255$ (M^+ , 15 %) | $m/z = 234$ (21 %) |
| $m/z = 263$ (18 %) | $m/z = 205$ (18 %) |
| $m/z = 262$ ($M^+ - SO_2NCH_3$, 100 %) | $m/z = 104$ (14 %) |
| $m/z = 261$ (7 %) | $m/z = 103$ (9 %) |

1H -NMR-Spektrum: DMSO- d_6 , 400,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm),
 $\vartheta = 25^\circ C$
 ^{13}C -NMR-Spektrum: DMSO- d_6 , 100,61 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm),
 $\vartheta = 25^\circ C$

6.2.1.17 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid (76)



Die Reaktion wird in Anlehnung an eine Vorschrift von Haller (1938 b) durchgeführt. 838 μ l 40 %ige wäßrige Dimethylaminlösung ($\rho = 0,89 \text{ g/cm}^3$) (entspricht 6,62 mmol Dimethylamin) werden in 5,6 ml Ethanol gelöst und die Lösung auf $0^\circ C$ gekühlt. Dazu wird unter intensivem Rühren und weiterem Kühlen portionsweise 1,00 g (3,34 mmol) 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonylchlorid zugegeben. Nach 15 min entsteht eine gelbe Lösung, aus der ein heller Niederschlag ausfällt. Nach zwei Stunden Rühren bei $0^\circ C$ gibt man etwa 3 g zerstoßenes Eis und 300 μ l 20 %ige Salzsäure hinzu, rührt kurz weiter, filtriert dann über eine Glasfritte (3), wäscht zweimal mit Wasser und trocknet im evakuierten Exsikkator über KOH.

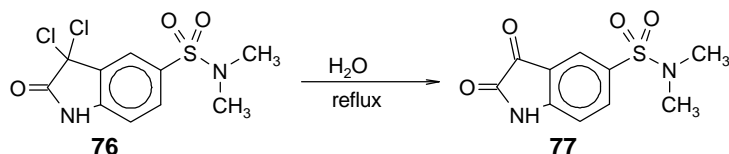
Das entstandene, hellgelbe Pulver (Ausbeute: 620 mg) kann direkt weiter zum entsprechenden Isatin-derivat umgesetzt werden.

Wird es aus Ethanol umkristallisiert (620 mg auf 4,3 ml Ethanol p.A.), so kristallisiert 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid in schwach gelblichen Prismen.

Ausbeute
 (nach Kristallisation): 409 mg, 1,32 mmol, 39,6 %
Molekulargewicht: 309,17 g/mol
Summenformel: $C_{10}H_{10}Cl_2N_2O_3S$

| | |
|---|---|
| <u>DC</u> (Kieselgel) | FM = n-Hexan / EE 1:1 $R_f = 0,39$ |
| <u>Elementaranalyse:</u> | Ber.: 38,8% C, 3,3 % H, 9,1 % N. Gef.: 38,6 % C, 3,2 % H, 9,1 % N. |
| <u>$^1\text{H-NMR-Spektrum}$:</u> | DMSO- d_6 , 400,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm), $\vartheta = 25\text{ }^\circ\text{C}$ |
| <u>$^{13}\text{C-NMR-Spektrum}$:</u> | DMSO- d_6 , 100,61 MHz; DMSO- d_5 als Standard (39,70 ppm), $\vartheta = 25\text{ }^\circ\text{C}$ |

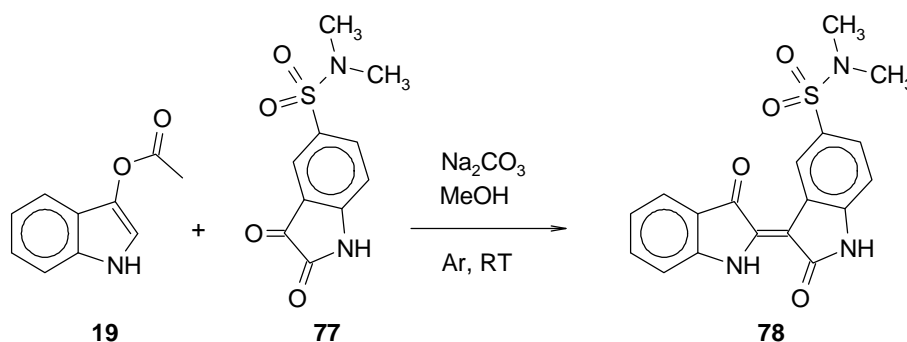
6.2.1.18 Isatin-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid (77)



Die Reaktion wird nach einer Vorschrift von Haller (1938 b) durchgeführt. Eine Suspension von 250 mg (0,809 mmol) 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid in 5 ml Wasser wird unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Im Laufe von 1-2 Stunden bildet sich eine klare, orangefarbene Lösung, aus der beim Abkühlen orangefarbene Kristalle ausfallen, die im evakuierten Exsikkator über KOH getrocknet werden.

| | |
|---|---|
| <u>Ausbeute:</u> | 152 mg, 0,599 mmol, 74,0 % |
| <u>Molekulargewicht:</u> | 254,27 g/mol |
| <u>Summenformel:</u> | $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ |
| <u>DC</u> (Kieselgel) | FM = n-Hexan / EE 1:1 $R_f = 0,18$ |
| <u>Elementaranalyse:</u> | Ber.: 47,2% C, 4,0 % H, 11,0 % N. Gef.: 46,7 % C, 4,0 % H, 10,8 % N. |
| <u>$^1\text{H-NMR-Spektrum}$:</u> | DMSO- d_6 , 400,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm), $\vartheta = 25\text{ }^\circ\text{C}$ |
| <u>$^{13}\text{C-NMR-Spektrum}$:</u> | DMSO- d_6 , 100,61 MHz; DMSO- d_5 als Standard (39,70 ppm), $\vartheta = 25\text{ }^\circ\text{C}$ |

6.2.1.19 Indirubin-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid (77)



SYN, 397 mg (1,56 mmol) Isatin-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid (77), 246 mg (1,40 mmol) Indoxylacetat, 8 ml Methanol, 344 mg (3,24 mmol) Natriumcarbonat.

Nach Trocknen am Ölpumpenvakuum wird die violette Substanz in möglichst wenig DMSO (200 mg auf 30 ml) vollständig gelöst und die Lösung in Wasser (30 ml) gegossen. Nachdem man die entstehende Suspension mit konz. Natriumchlorid-Lösung versetzt hat, filtriert man und spült mit viel Wasser nach. Die Trocknung des Rückstands erfolgt im evakuierten Exsikkator über Kaliumhydroxid. Indirubin-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid (78) fällt als violettes Pulver an.

| | |
|--------------------------|--|
| <u>Ausbeute:</u> | 240 mg, 0,651 mmol, 46,5 % |
| <u>Molekulargewicht:</u> | 369,43 g/mol |
| <u>Summenformel:</u> | $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ |

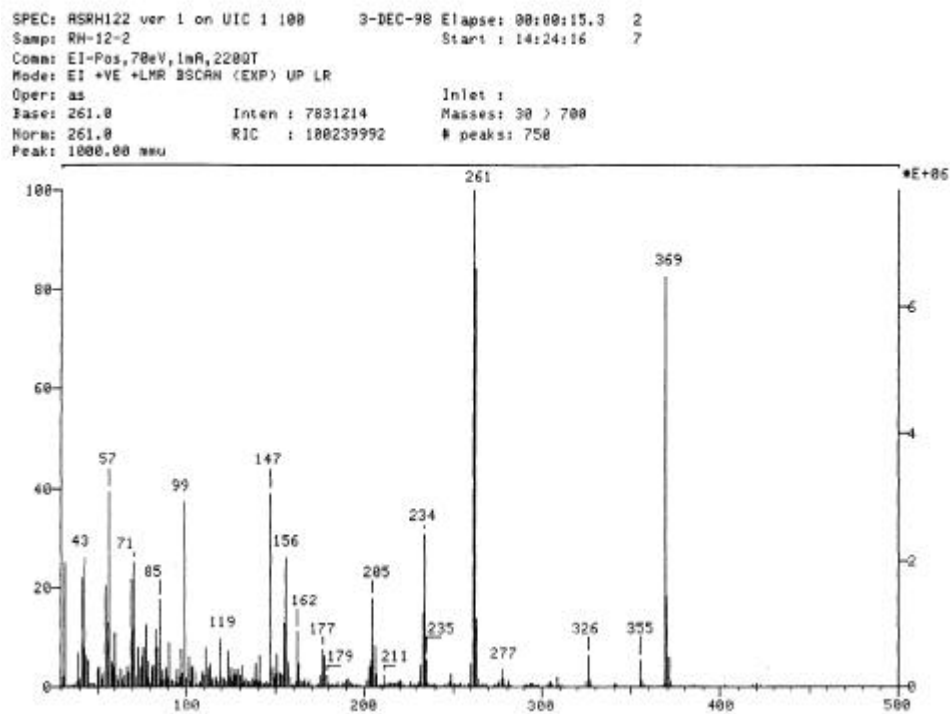
DC (Kieselgel)

FM = n-Hexan / EE 2:3

 $R_f = 0,39$ Elementaranalyse:

Ber.: 58,5% C, 4,1 % H, 11,4 % N.

Gef.: 57,8 % C, 4,0 % H, 11,2 % N.

Massenspektrum (70eV)m/z = 369 (M^+ , 83 %)

m/z = 99 (37 %)

m/z = 326 ($M^+ - CH_3NCH_2$, 6 %)

m/z = 85 (18 %)

m/z = 262 (84 %)

m/z = 83 (12 %)

m/z = 261 ($M^+ - CH_3NCH_2 - SO_2H$, 100 %)

m/z = 77 (13 %)

m/z = 234 (31 %)

m/z = 71 (25 %)

m/z = 233 (15 %)

m/z = 69 (22 %)

m/z = 205 (18 %)

m/z = 57 (39 %)

m/z = 162 (11 %)

m/z = 56 (13 %)

m/z = 156 (26 %)

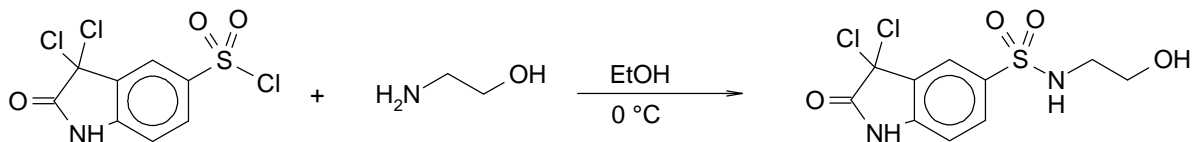
m/z = 55 (20 %)

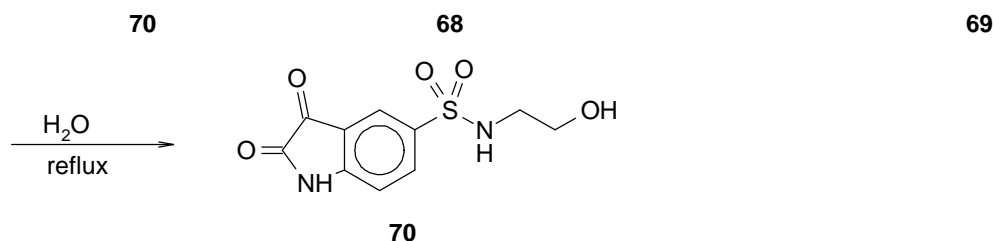
m/z = 155 (13 %)

m/z = 43 (26 %)

m/z = 147 (39 %)

m/z = 41 (22 %)

 1H -NMR-Spektrum:DMSO- d_6 , 200,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm), $\vartheta = 25^\circ C$ ^{13}C -NMR-Spektrum:DMSO- d_6 , 100,61 MHz; DMSO- d_5 als Standard (39,70 ppm), $\vartheta = 25^\circ C$ **6.2.1.20 Isatin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid (81)**

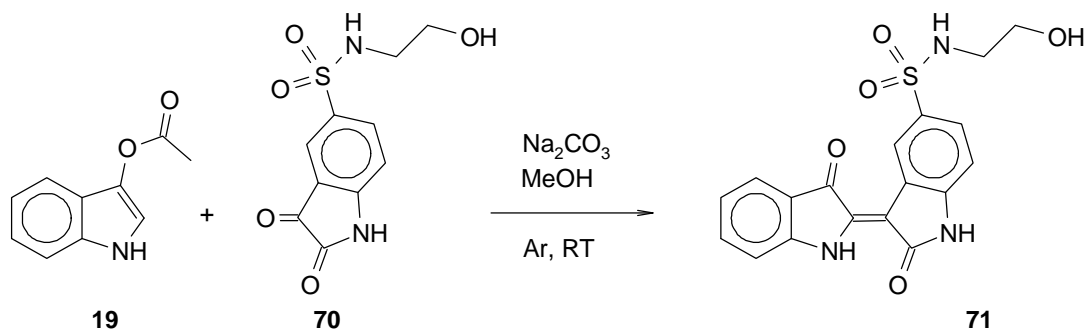


300 μl (295 mg, 4,83 mmol) Ethanolamin werden in 5,1 ml Ethanol gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dazu werden unter intensivem Rühren und weiterem Kühlen portionsweise 900 mg (3,01 mmol) 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonylchlorid zugegeben. Nach 30 min gibt man weitere 100 μl (98 mg, 1,61 mmol) Ethanolamin hinzu und läßt noch 15 min rühren. Nach Zugabe von 20 g zerstoßenem Eis und 900 μl 20 %iger Salzsäure trübt sich die Lösung ein. Nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur verschwindet die Trübung wieder und es hat sich ein öliger Bodensatz gebildet.

Der Überstand wird abdekantiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, worauf ein öliger gelber Rückstand zurück bleibt. Nach Zugabe von 5 ml Wasser wird der Rückstand 2 Stunden unter Rückfluß zum Sieden erhitzt; das Reaktionsgemisch nimmt einen orangefarbenen Ton an. Nach dem Abkühlen bei 4 °C scheiden sich gelbe Kristalle ab. Nach der Filtration erfolgt die Trocknung im evakuierten Exsikkator über KOH.

| | |
|------------------------------------|---|
| <u>Ausbeute:</u> | 374 mg, 1,38 mmol, 45,8 % |
| <u>Molekulargewicht:</u> | 271,20 g/mol |
| <u>Summenformel:</u> | C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₅ S |
| <u>DC</u> (Kieselgel) | FM = EE / Methanol 20:1 R _f = 0,52 |
| <u>¹H-NMR-Spektrum:</u> | DMSO-d ₆ , 400,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm), ϑ = 25 °C |

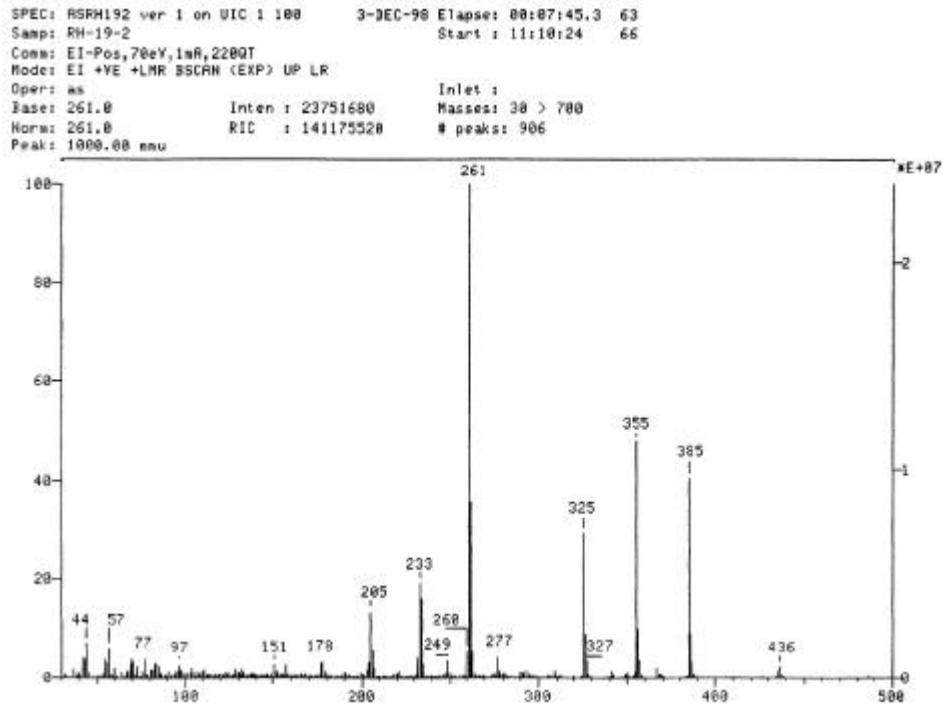
6.2.1.21 Indirubin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid (**82**)



SYN, 150 mg (0,630 mmol) Isatin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid (**81**), 83 mg (0,47 mmol) Indoxylacetat, 4 ml Methanol, 116 mg (1,09 mmol) Natriumcarbonat.

Indirubin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid (**82**) fällt als violette Pulver an.

| | |
|------------------------------|--|
| <u>Ausbeute:</u> | 143 mg, 0,371 mmol, 78,9 % |
| <u>Molekulargewicht:</u> | 385,40 g/mol |
| <u>Summenformel:</u> | C ₁₈ H ₁₅ N ₃ O ₅ S |
| <u>DC</u> (Kieselgel) | FM = EE / Methanol 20/1 R _f = 0,62 |
| <u>Elementaranalyse:</u> | Ber (0,25 % H ₂ O): 55,5% C, 4,0 % H, 10,8 % N. Gef.: 55,3 % C, 4,1 % H, 10,6 % N. |
| <u>Massenspektrum</u> (70eV) | |

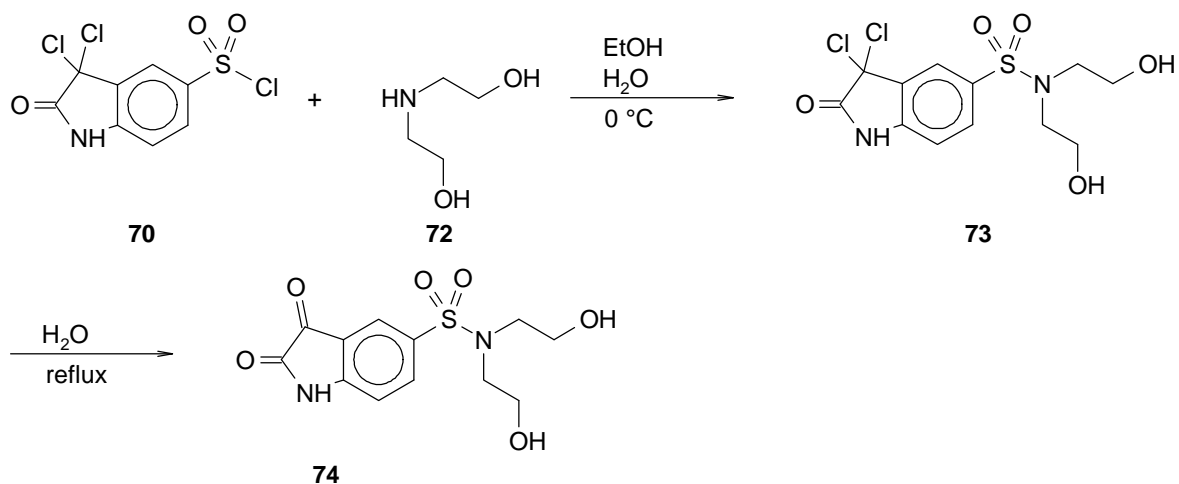


| | |
|---|--|
| $m/z = 385$ (M^+ , 40 %) | $m/z = 234$ (16 %) |
| $m/z = 355$ ($M^+ - \text{CH}_2\text{O}$, 48 %) | $m/z = 233$ ($M^+ - \text{SO}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH} - \text{CO}$, 19 %) |
| $m/z = 325$ ($M^+ - \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, 29 %) | $m/z = 205$ ($M^+ - \text{SO}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH} - 2$ |
| $m/z = 262$ (35 %) | CO , 13 %) |
| $m/z = 261$ ($M^+ - \text{SO}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, 100 %) | |

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum: DMSO- d_6 , 400,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm),
 $\vartheta = 25^\circ\text{C}$

$^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum: DMSO- d_6 , 100,61 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm),
 $\vartheta = 25^\circ\text{C}$

6.2.1.22 Isatin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid (85)



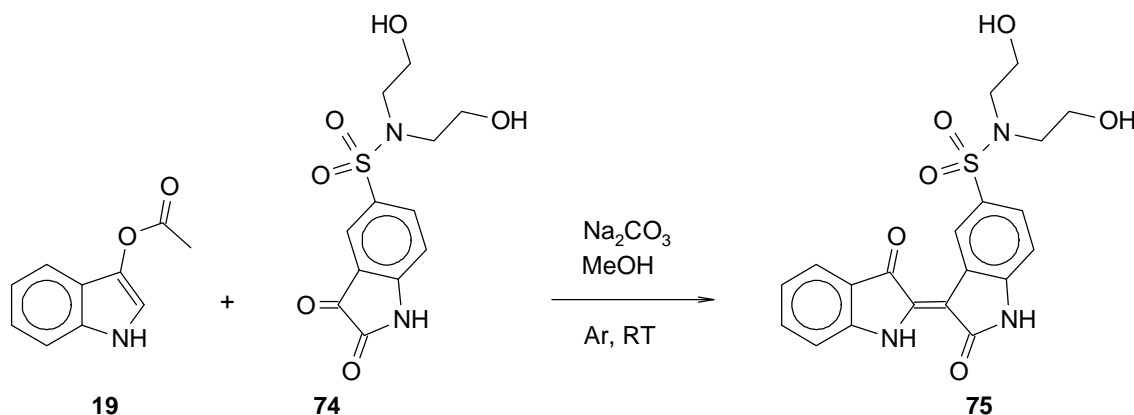
526 mg (5,00 mmol) Diethanolamin (Bis(2-hydroxyethyl)amin) und 450 μl Wasser werden in 5,6 ml Ethanol gelöst und die Lösung auf 0°C gekühlt. Dazu wird unter intensivem Rühren und weiterem Kühlen portionsweise 1,00 g (3,34 mmol) 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonylchlorid zugegeben. Man rührt, bis auf der DC kein Edukt mehr zu sehen ist (etwa 2 Stunden). Nach Zugabe von 10 g zerstoßnem Eis und 1000 μl 20 %iger Salzsäure trübt sich die Lösung ein, und größere Substanzklumpen

fallen aus. Man läßt auf Raumtemperatur erwärmen und pipettiert die klare Lösung vom zurückbleibenden ölig-schlammigen Niederschlag ab.

Der Rückstand wird mit 5 ml Wasser versetzt und unter Rückfluß 1-2 Stunden zum Sieden erhitzt; ebenso wird mit der abpipettierten Lösung verfahren. Die beiden orangefarbenen bis roten Hydrolysate beläßt man 1-2 Tage bei 4 °C, worauf jeweils rote Kristalle ausfallen. Trocknung erfolgt am Ölpumpenvakuum.

| | |
|-------------------------------------|--|
| <u>Ausbeute:</u> | 476 mg, 1,51 mmol, 45,3 % |
| <u>Molekulargewicht:</u> | 314,32 g/mol |
| <u>Summenformel:</u> | C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₆ S |
| <u>DC (Kieselgel)</u> | FM = EE / Methanol 20:1 R _f = 0,51 |
| <u>¹H-NMR-Spektrum:</u> | DMSO-d ₆ , 400,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm), ϑ = 25 °C |
| <u>¹³C-NMR-Spektrum:</u> | DMSO-d ₆ , 100,61 MHz; DMSO-d ₅ als Standard (39,70 ppm), ϑ = 25 °C |

6.2.1.23 Indirubin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid (**86**)

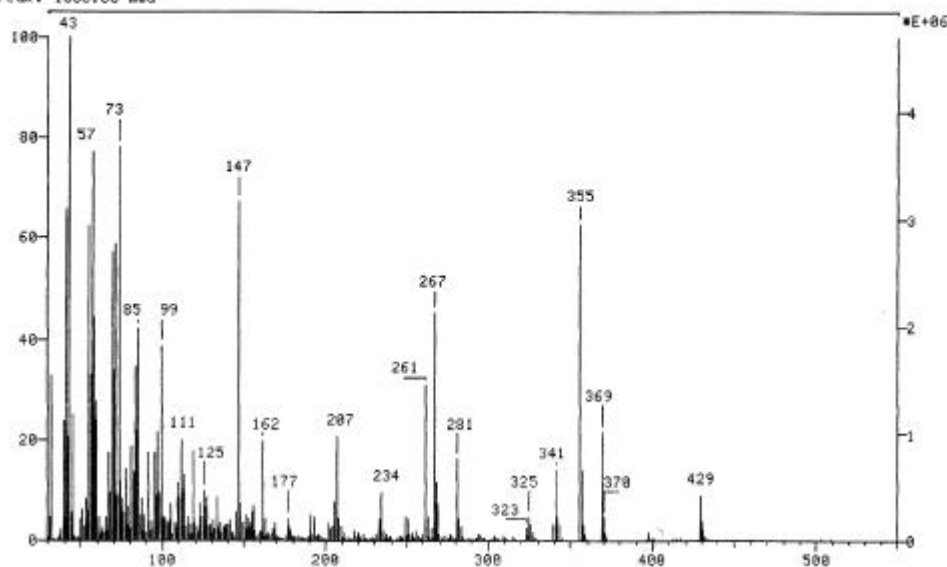


SYN, 400 mg (1,27 mmol) Isatin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid (**85**), 167 mg (0,953 mmol) Indoxylacetat, 8 ml Methanol, 234 mg (2,20 mmol) Natriumcarbonat.

Indirubin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid (**86**) fällt als violettes Pulver an.

| | |
|------------------------------|---|
| <u>Ausbeute:</u> | 355 mg, 0,827 mmol, 86,7 % |
| <u>Molekulargewicht:</u> | 429,45 g/mol |
| <u>Summenformel:</u> | C ₂₀ H ₁₉ N ₃ O ₆ S |
| <u>DC (Kieselgel)</u> | FM = EE / Methanol 20/1 R _f = 0,51 |
| <u>Massenspektrum (70eV)</u> | |

SPEC: ASRH311A ver 1 on UIC 1 100 3-DEC-98 Elapse: 00:00:18.1 2
 Samp: RH 31-1 Start : 14:31:43 9
 Com: EI-POS, 70eV, 1uA, 2200T
 Mode: EI +VE +LMR BSCAN (EXP) UP LR
 Oper: as Inlet :
 Base: 43.0 Inten : 4708306 Masses: 30 > 700
 Norm: 43.0 RIC : 185444672 # peaks: 784
 Peak: 1000.00 muu

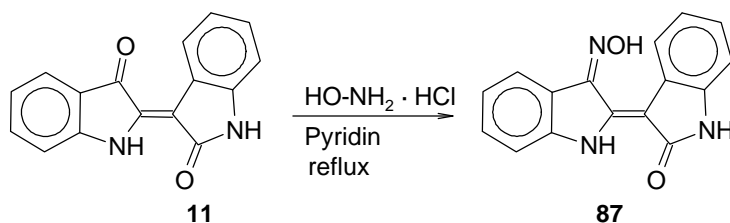


| | |
|--|--|
| m/z = 429 (M^+ , 9 %) | m/z = 207 (21 %) |
| m/z = 369 (M^+ - CH_2OH (α -Spaltung) - CHO, 22 %) | m/z = 205 (M^+ - $\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$ - 2 CO, 8 %) |
| m/z = 356 (22 %) | m/z = 162 (20 %) |
| m/z = 355 (M^+ - CH_2OH (α -Spaltung) - CH_2O (McLafferty-Umlagerung) - CH, 63 %) | m/z = 147 (67%) |
| m/z = 325 (M^+ - $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$, 5 %) | m/z = 119 (18 %) |
| m/z = 281 (16%) | m/z = 99 (38 %) |
| m/z = 267 (45 %) | m/z = 85 (42 %) |
| m/z = 262 (26 %) | m/z = 73 (78%) |
| m/z = 261 (M^+ - $\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$, 31 %) | m/z = 57 (77 %) |
| | m/z = 43 (100 %) |

$^1\text{H-NMR-Spektrum}$: DMSO- d_6 , 400,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm),
 $\vartheta = 25^\circ\text{C}$

$^{13}\text{C-NMR-Spektrum}$: DMSO- d_6 , 100,61 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm),
 $\vartheta = 25^\circ\text{C}$

6.2.1.24 Indirubin-3'-oxim (87)

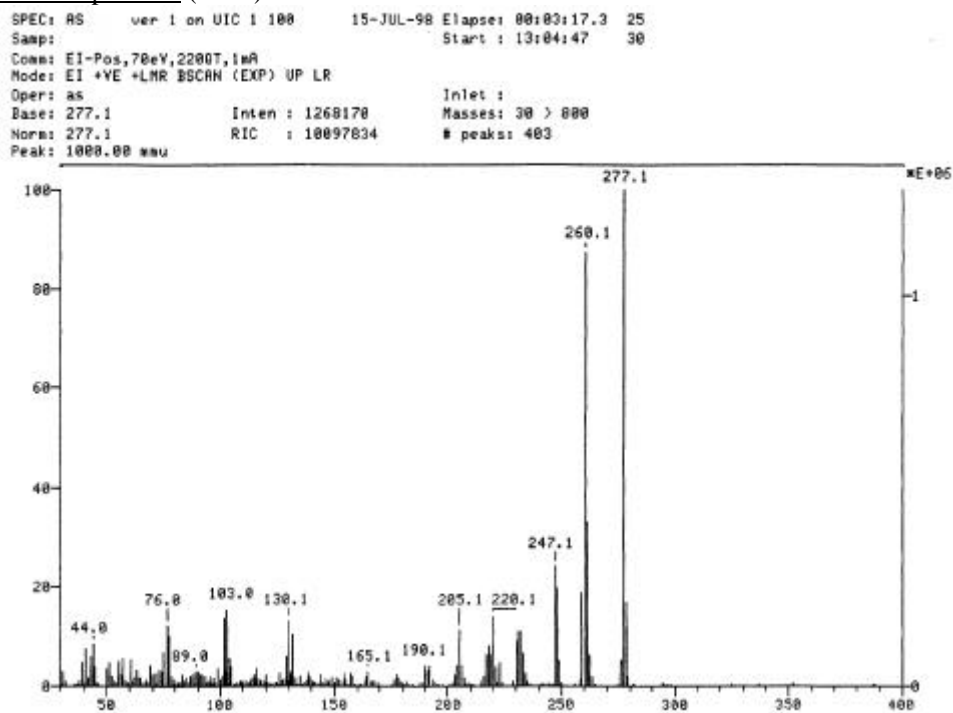


Die Synthese wird nach einer Vorschrift von Farbwerke vorm. Meister Lucius & Brüning (1913) durchgeführt. 500 mg (1,91 mmol) Indirubin werden mit 350 mg (5,04 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid in 15 ml Pyridin unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach 1,5 Stunden wird die Reaktionsmischung in 100 ml 1 n Salzsäure gegossen. Die entstehenden roten Flocken werden abfiltriert und in 150 ml 1 n Natronlauge gelöst. Die entstehende rote Lösung wird filtriert und bis zur sauren Reaktion mit 1 n Salzsäure versetzt. Die erneut ausfallende tiefrote Substanz wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Kristallisation erfolgt bei -20°C aus einer gesättigten ethanolschen

Lösung, der Wasser zugesetzt wird (100 mg auf 7,0 ml Ethanol; 2,0 ml Wasser) und aus der Indirubin-3'-oxim (**87**) in roten Kristallen ausfällt. Trocknung erfolgt am Ölpumpenvakuum und im evakuierten Exsikkator über KOH.

| | |
|--------------------------|--|
| <u>Ausbeute:</u> | 418 mg, 1,51 mmol, 78,9 % |
| <u>Molekulargewicht:</u> | 277,30 g/mol |
| <u>Summenformel:</u> | C ₁₆ H ₁₁ N ₃ O ₂ |
| <u>DC (Kieselgel)</u> | FM = n-Hexan / EE 1:1 R _f = 0,55 |
| <u>Elementaranalyse:</u> | Ber. (1/4 H ₂ O): 68,2% C, 4,1 % H, 14,9 % N. Gef.: 68,4 % C, 4,1 % H, 14,8 % N. |

Massenspektrum (70eV)

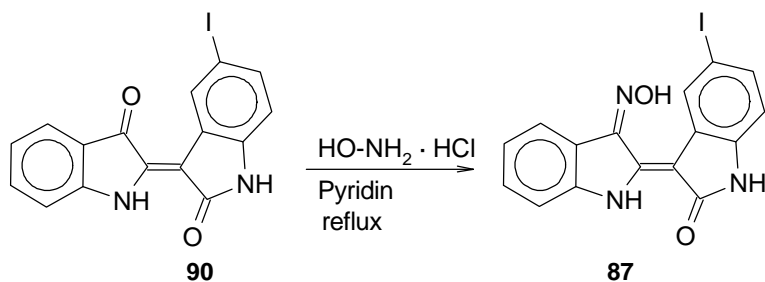


| | |
|---|--|
| m/z = 277 (M ⁺ , 100 %) | m/z = 205 (M ⁺ - NO - CO - N, 11 %) |
| m/z = 260 (M ⁺ - OH, 87 %) | m/z = 190 (4 %) |
| m/z = 247 (M ⁺ - NO, 24 %) | m/z = 130 (13 %) |
| m/z = 220 (M ⁺ - NO - HCN, 14 %) | m/z = 103 (16 %) |
| m/z = 219 (M ⁺ - NO - CO, 6 %) | m/z = 76 (12 %) |

¹H-NMR-Spektrum: DMSO-d₆, 400,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm),
 δ = 25 °C

¹³C-NMR-Spektrum: DMSO-d₆, 100,61 MHz; DMSO-d₅ als Standard (39,70 ppm),
 δ = 25 °C

6.2.1.25 5-Iodindirubin-3'-oxim (**91**)



Die Synthese wird in Anlehnung an eine Vorschrift von Farbwerke vorm. Meister Lucius & Brüning (1913) durchgeführt. 250 mg (0,644 mmol) 5-Iodindirubin (**90**) werden mit 175 mg (2,52 mmol)

Hydroxylaminhydrochlorid in 7,5 ml Pyridin unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach 45 min wird die Reaktionsmischung in 50 ml 1 n Salzsäure gegossen. Die entstehenden roten Flocken werden abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Umkristallisation erfolgt aus Ethanol. Der klaren Lösung kann zur Beschleunigung der Kristallisation *n*-Pentan zugefügt werden. Trocknung erfolgt am Ölpumpenvakuum.

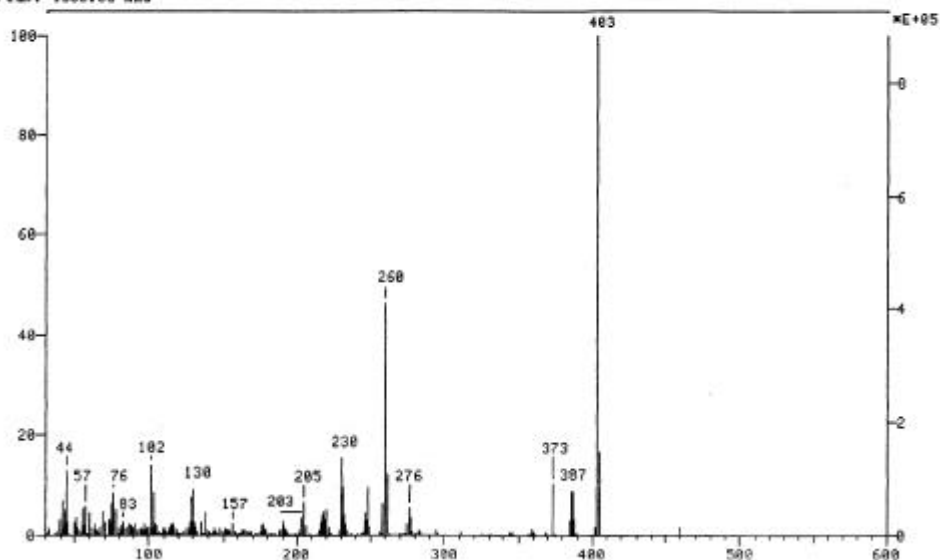
| | |
|--------------------------|--|
| <u>Ausbeute:</u> | 119 mg, 0,296 mmol, 45,9 % |
| <u>Molekulargewicht:</u> | 403,20 g/mol |
| <u>Summenformel:</u> | $C_{16}H_{10}IN_3O_2$ |
| <u>DC (Kieselgel)</u> | FM = <i>n</i> -Hexan / EE 1:1 $R_f = 0,58$ |
| <u>Elementaranalyse:</u> | Ber.: 47,7 % C, 2,5 % H, 10,4 % N. Gef.: 47,1 % C, 2,5 % H, 10,1 % N. |

Massenspektrum (70eV)

```

SPEC: AS ver 1 on UIC 1 100 15-JUL-98 Elapse: 00:02:51.9 22
Samp: Start : 13:13:46 33
Com: EI-Pos,70eV,2200T,1aR
Mode: EI +VE +LHR 3SCAN <EXP> UP LR
Oper: as Inlet :
Base: 403.0 Inten : 885826 Masses: 30 > 800
Norm: 403.0 RIC : 5995362 # peaks: 421
Peak: 1800.00 muu

```



| | |
|-------------------------------------|--------------------|
| $m/z = 403$ (M^+ , 100 %) | $m/z = 230$ (15 %) |
| $m/z = 387$ ($M^+ - O$, 9 %) | $m/z = 205$ (7 %) |
| $m/z = 373$ (10 %) | $m/z = 103$ (9 %) |
| $m/z = 276$ ($M^+ - I$, 5 %) | $m/z = 102$ (14 %) |
| $m/z = 260$ ($M^+ - O - I$, 46 %) | |

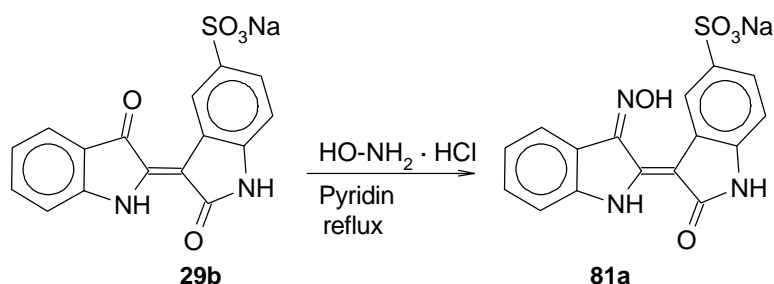
1H -NMR-Spektrum: DMSO- d_6 , 400,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm),

$\vartheta = 25$ °C

^{13}C -NMR-Spektrum: DMSO- d_6 , 100,61 MHz; DMSO- d_5 als Standard (39,70 ppm),

$\vartheta = 25$ °C

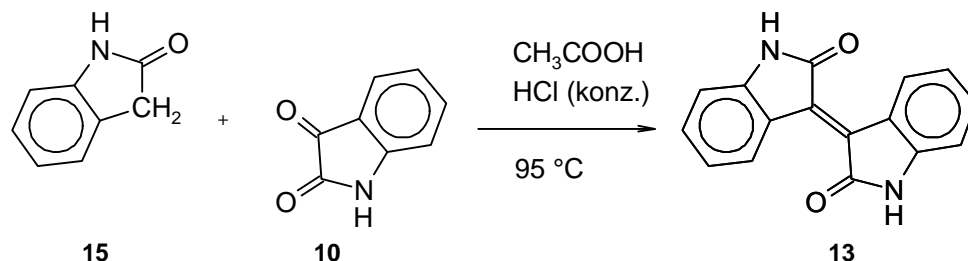
6.2.1.26 3'-Hydroxyiminindirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (92a)



Die Synthese wird in Anlehnung an eine Vorschrift von Farbwerke vorm. Meister Lucius & Brüning (1913) durchgeführt. 500 mg (1,44 mmol) Natriumsalz der Indirubin-5-sulfonsäure (**29b**) werden mit 400 mg (5,76 mmol) Hydroxylaminhydrochlorid in 15 ml Pyridin unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach 20 min wird die abgekühlte Lösung in 100 ml 1 n Salzsäure gegossen. Nach Zugabe von 20 ml gesättigter Natriumchloridlösung setzt sich das Oxim am Gefäßboden ab. Nach Filtration wird das Filtrat mit 15 ml gesättigter Natriumchloridlösung versetzt worauf erneut Substanz ausfällt. Die beiden Rückstände werden vereinigt und getrocknet. Umkristallisation erfolgt aus Wasser (200 mg auf 12,5 ml Wasser), woraus sich eine gelartige Masse ausscheidet, die nur schwer filtrierbar ist. Im evakuierten Exsikkator wird die feuchte, dunkelrote Masse über KOH getrocknet. Die entstehenden schwarzen, rötlich schimmernden und spröden Schuppen werden gemörsert und einigen Stunden bei 140 °C am Ölpumpenvakuum von Wasserspuren befreit. Man erhält das Natriumsalz der 3'-Hydroxyiminindirubin-5-sulfonsäure als schwarzes Pulver.

| | |
|---|---|
| <u>Ausbeute:</u> | 170 mg, 0,490 mmol, 34,0 % |
| <u>Molekulargewicht:</u> | 379,33 g/mol |
| <u>Summenformel:</u> | $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{NaO}_5\text{S}$ |
| <u>DC (Kieselgel)</u> | FM = Ethanol $R_f = 0,76$ |
| <u>Elementaranalyse:</u> | Ber.: 50,7% C, 2,7 % H, 11,1 % N. Gef.: 50,1 % C, 3,0 % H, 10,9 % N. |
| <u>$^1\text{H-NMR}$-Spektrum:</u> | DMSO- d_6 , 200,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm), $\vartheta = 25^\circ\text{C}$ |
| <u>$^{13}\text{C-NMR}$-Spektrum:</u> | DMSO- d_6 , 100,61 MHz; DMSO- d_5 als Standard (39,70 ppm), $\vartheta = 25^\circ\text{C}$ |

6.2.2 Isoindigo (13)

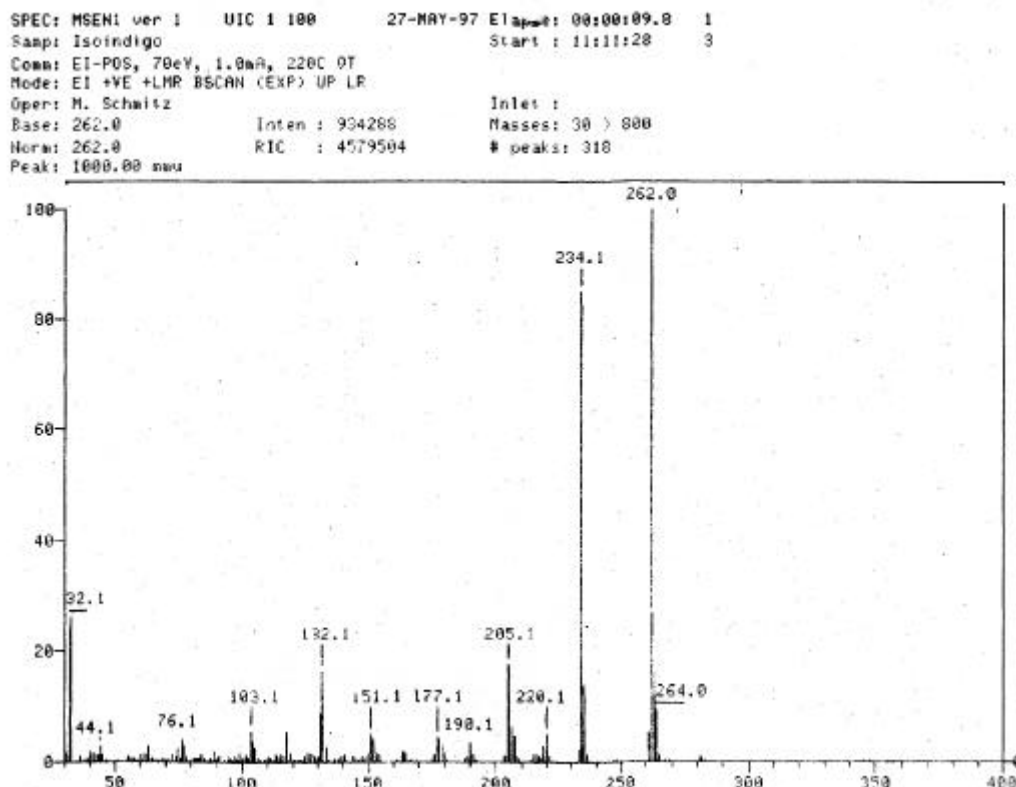


Die Synthese wird nach einer Vorschrift von Wahl und Bagard (1909 a und b) durchgeführt. 1,35 g (10,1 mmol) Oxindol (**15**) und 1,50 g (10,2 mmol) Isatin (**10**) werden in 30 ml Essigsäure, der 0,5 ml konzentrierte Salzsäure zugesetzt wurden, auf dem kochenden Wasserbad erhitzt. Die Lösung verfärbt sich braun. Nach 2,75 Stunden wird die Reaktion beendet. Man läßt abkühlen und filtriert den Ansatz über eine Glasfritte (4). Das Rohprodukt wird mit je 30 ml Methanol und Diethylether gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Isoindigo (**13**) liegt dann als braunes Pulver vor.

| | |
|--------------------------|--|
| <u>Ausbeute:</u> | 2,23 g (8,50 mmol, 83,9 %) |
| <u>Molekulargewicht:</u> | 262,26 g/mol |
| <u>Summenformel:</u> | $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ |
| <u>DC (Kieselgel)</u> | FM = n-Hexan / EE 1:1 $R_f = 0,67$ |

Elementaranalyse: Ber.: 73,3 % C, 3,8 % H, 10,7 % N
 Gef.: 73,0 % C, 3,8 % H, 10,9 % N

Massenspektrum (70eV)



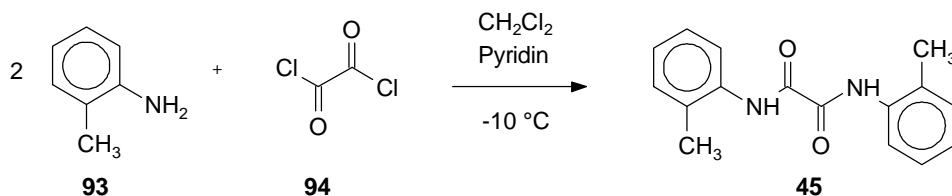
| | |
|--|--------------------|
| $m/z = 262$ (M^+ , 100 %) | $m/z = 177$ (5 %) |
| $m/z = 234$ ($M^+ - CO$, 85 %) | $m/z = 151$ (5 %) |
| $m/z = 220$ ($M^+ - CO - N$, 5 %) | $m/z = 132$ (17 %) |
| $m/z = 205$ ($M^+ - CO - HCO$, 18 %) | $m/z = 103$ (6 %) |
| $m/z = 190$ (4 %) | $m/z = 76$ (4 %) |

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum: DMSO- d_6 , 400,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm), $\vartheta = 25^\circ\text{C}$

$^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum: DMSO- d_6 , 100,61 MHz; DMSO- d_5 als Standard (39,70 ppm), $\vartheta = 25^\circ\text{C}$

6.2.3 Weitere

6.2.3.1 *N,N'*-Di-*o*-tolylloxalamid (**45**)

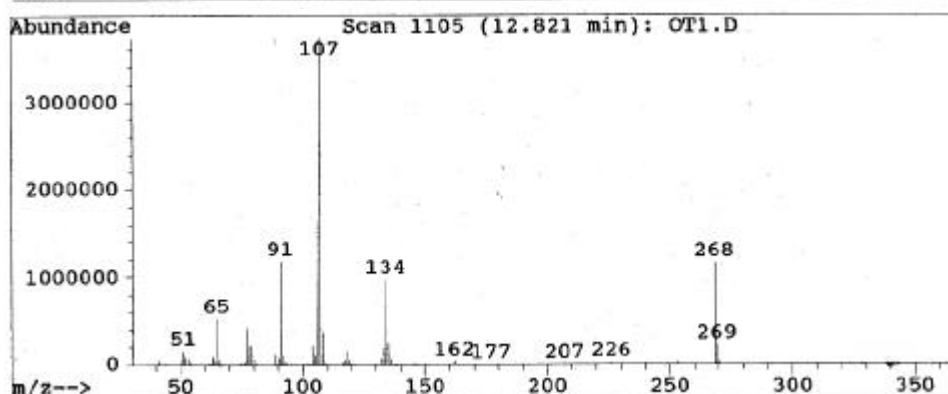
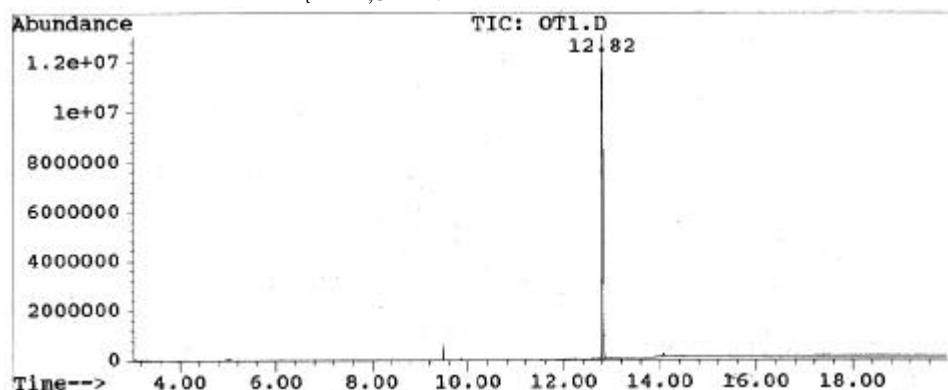


Die Reaktion wird unter Schutzgas mit getrockneten Lösungsmitteln durchgeführt. Zu einer Lösung von 16,0 ml (16,0 g, 0,152 mol) frisch destilliertem *o*-Toluidin (**93**) und 25,0 ml Pyridin in 180 ml Dichlormethan, die mit einer Eis/Kochsalzmischung gekühlt wird, wird langsam eine Lösung von 6,7 ml (9,7 g, 0,076 mol) Oxalylchlorid (**94**) in 250 ml Dichlormethan so zugetropft, daß eine Temperatur von -10°C nicht überschritten wird. Anschließend entfernt man das Kältebad und rührt noch 3 Stunden bei Raumtemperatur. Die Reaktionsmischung wird 4 mal mit je 300 ml 0,1 n Salzsäure ausgeschüttelt, 2 mal mit je 300 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 2 mal mit Wasser. Stets bleibt dabei ein farbloser Niederschlag in der organischen Phase zurück, der immer mit ausge-

schüttelt wird. Das Lösungsmittel der organische Phase wird abdestilliert und der verbleibende Rückstand aus Chloroform umkristallisiert. *N,N'*-Di-*o*-tolylloxalamid (**45**) kristallisiert in farblosen Nadeln.

| | |
|--------------------------|--|
| <u>Ausbeute:</u> | 11,2 g, 0,0417 mol, 54,9 % |
| <u>Molekulargewicht:</u> | 268,32 g/mol |
| <u>Summenformel:</u> | C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₂ |
| <u>DC</u> (Kieselgel) | FM = n-Hexan / EE 1:1 R _f = 0,90 (UV) |
| <u>Elementaranalyse:</u> | Ber.: 71,6% C, 6,0 % H, 10,4 % N. Gef.: 71,5 % C, 5,9 % H, 10,2 % N. |
| <u>GC/MS-Analytik:</u> | Bedingungen: 80 °C(4 min.) $\xrightarrow{25^\circ/\text{min}}$ 320°C (16,4 min) |

R_t = 12,8 min.

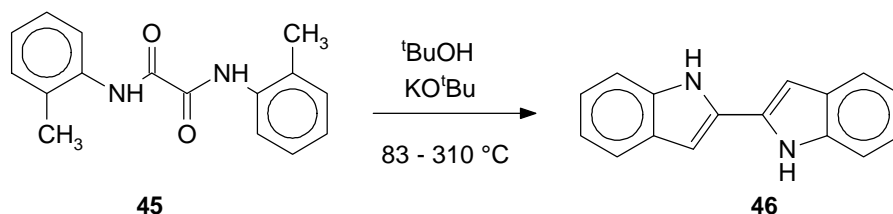


| | |
|---|------------------|
| m/z = 269 (7 %) | m/z = 106 (44 %) |
| m/z = 268 (M ⁺ , 31 %) | m/z = 91 (19 %) |
| m/z = 134 (M ²⁺ oder (M/2) ⁺ , 26%) | m/z = 65 (13 %) |
| m/z = 107 ((M/2 - HCN) ⁺ , 100 %) | |

¹H-NMR-Spektrum: CDCl₃, 90 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm), $\vartheta = 25^\circ\text{C}$

¹³C-NMR-Spektrum: CDCl₃, 100,61 MHz; CHCl₃ = 77,00 ppm als Standard, $\vartheta = 25^\circ\text{C}$

6.2.3.2 2,2'-Bisindol (**46**)



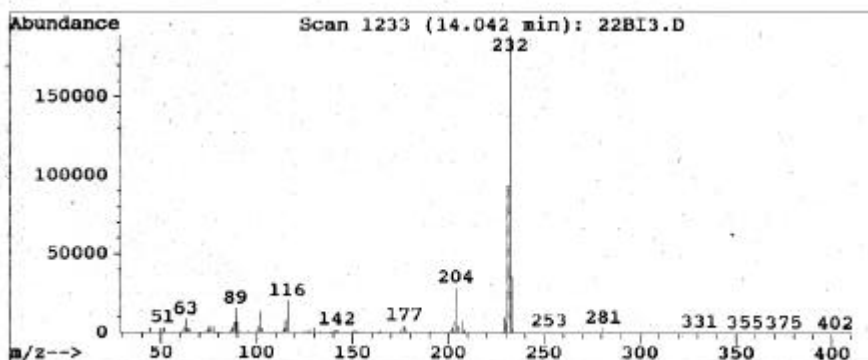
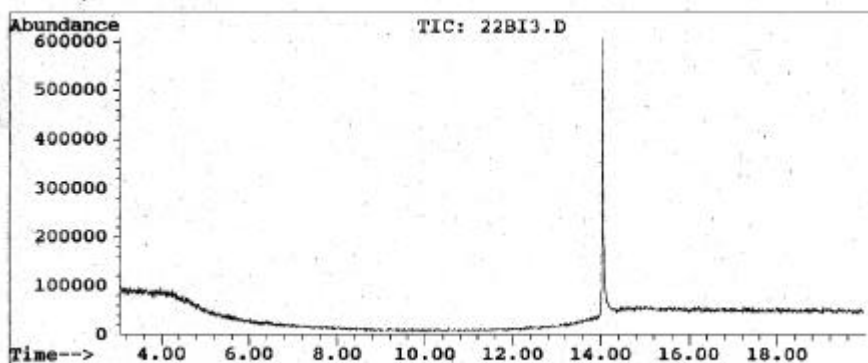
Die Reaktion wird unter Schutzgas mit getrocknetem Lösungsmittel in einem 25-ml-Dreihalskolben mit Destillationsbrücke und Thermometer nach einer Vorschrift von Bergman et al. (1995) durchge-

führt. 1,10 g (4,10 mmol) *N,N'*-Di-*o*-tolyloxalamid (**45**) werden in 6,0 ml *t*-Butanol aufgeschlämmt. Dazu gibt man 2,20 g (19,6 mmol) Kalium-*t*-butanolat, legt bis zum Ende der Reaktion einen leichten Schutzgasstrom über das Reaktionsgemisch und rührt. Das Gemisch wird erhitzt, bis das ganze *t*-Butanol überdestilliert ist; dann erhitzt man weiter, bis das Gemisch eine Temperatur von 225 °C hat. Die Reaktionsmischung verflüssigt sich, schäumt auf und färbt sich leicht braun. Man hält die Temperatur für 5 min. Es bilden sich farblose, leichte Flocken, die vom Schutzgasstrom mitgerissen werden. Man erhitzt dann auf 270 °C, worauf sich die Masse zu dunklem Braun verfärbt. Nach 15 min erhitzt man auf 300 – 310 °C; die Mischung wirft Blasen und schäumt leicht. Nach 15 min entfernt man die Heizung und läßt auf Raumtemperatur abkühlen.

Man gibt 8 ml Wasser zum Reaktionsgemisch. Die entstehende ockerfarbene Suspension wird abzentrifugiert. Der Rückstand wird in 6 ml Ethanol aufgeschlämmt, auf 4 °C abgekühlt und zentrifugiert. Der letzte Vorgang wird noch zweimal mit je 3 ml Ethanol wiederholt. Nach vollständigem Entfernen des Ethanols wird der Rückstand aus einem Dioxan/Essigsäureanhydrid-Gemisch (5:3) dreimal umkristallisiert. Man erhält 2,2'-Bisindol (**46**) als leicht bräunliche Kristallnadeln.

| | |
|--------------------------|--|
| <u>Ausbeute:</u> | 384 mg, 1,65 mmol, 40,3 % |
| <u>Molekulargewicht:</u> | 232,28 g/mol |
| <u>Summenformel:</u> | C ₁₆ H ₁₂ N ₂ |
| <u>DC</u> (Kieselgel) | FM = n-Hexan / EE 1:1 R _f = 0,82 (UV) |
| <u>Elementaranalyse:</u> | Ber.: 82,7% C, 5,2 % H, 12,1 % N. Gef.: 82,9 % C, 5,1 % H, 12,0 % N. |
| <u>GC/MS-Analytik:</u> | Bedingungen: 80 °C(4 min.) $\xrightarrow{25^\circ/\text{min}}$ 320°C (16,4 min) |

R_t = 14,1 min.



m/z = 232 (M⁺, 100 %)
m/z = 231 (45 %)
m/z = 204 (13 %)

m/z = 116 (M²⁺ oder (M/2)⁺, 18 %)
m/z = 102 (11 %)
m/z = 99 (7 %)

UV/vis-Spektrum
(Ethanol), λ_{max} (log_ε)

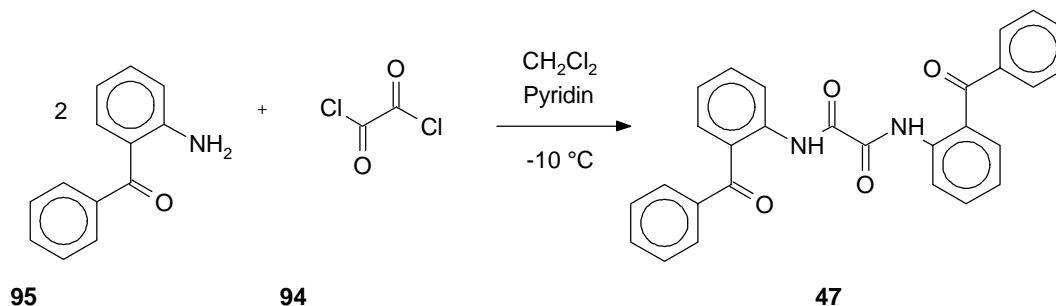
221 nm (4,78), 271 nm (4,00), 333 nm (4,80),
351 nm (4,79),

¹H-NMR-Spektrum:

DMSO-d₆, 400,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm),
ϑ = 25 °C

¹³C-NMR-Spektrum: DMSO-d₆, 100,61 MHz; DMSO-d₅ als Standard (39,70 ppm),
 δ = 25 °C

6.2.3.3 N,N'-Bis(2-benzoylphenyl)-oxamid (47)

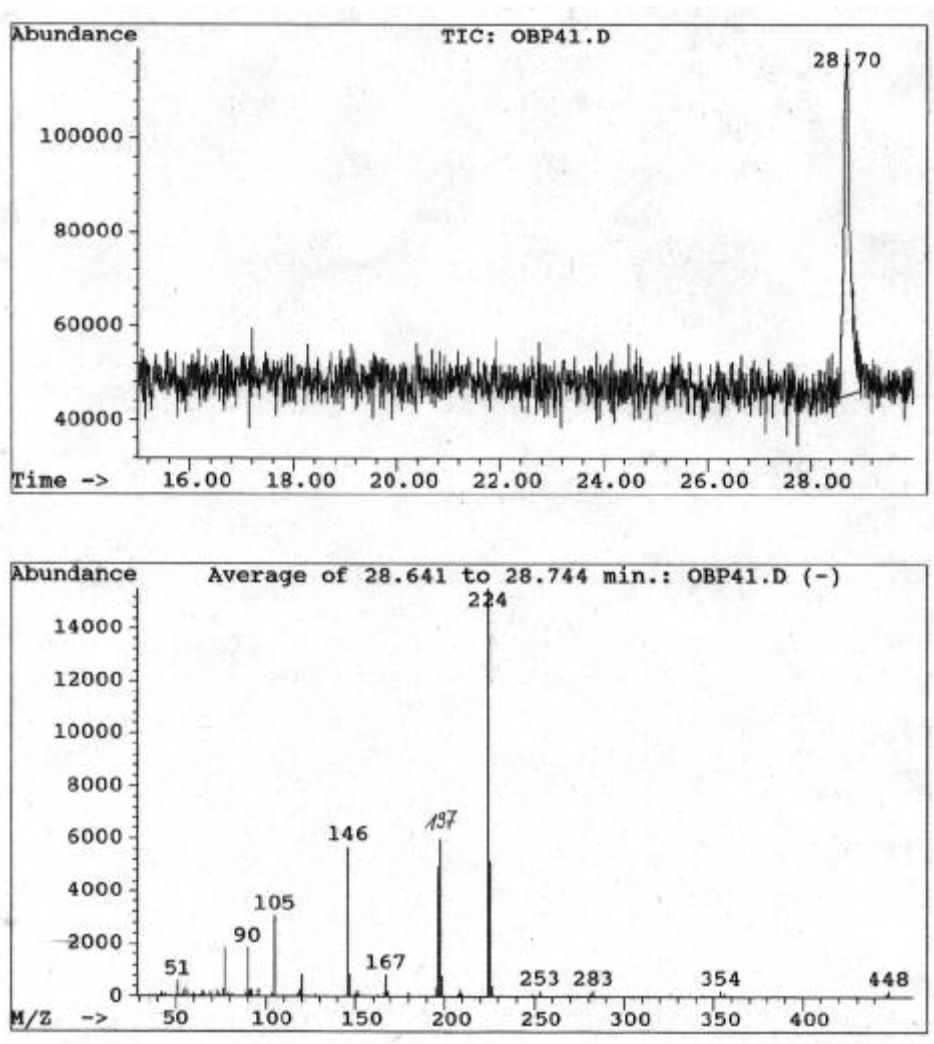


Die Reaktion wird unter Schutzgas, mit getrockneten Lösungsmitteln durchgeführt. Zu einer Lösung von 100 mg (0,51 mmol) 2-Aminobenzophenon (**95**) in 900 µl Dichlormethan und 100 µl Pyridin, die mit einer Eis/Kochsalzmischung gekühlt wird, wird langsam und unter Rühren eine Lösung von 33 µl (49 mg; 0,38 mmol) Oxalylchlorid (**94**) in 1 ml trockenem Dichlormethan getropft. Es bildet sich bereits nach den ersten Tropfen eine farblose Suspension, die sich zunehmend eintrübt. Nach einer halben Stunde Rühren bei etwa -20 °C läßt man die Mischung auf Raumtemperatur erwärmen und rührt nochmals eine halbe Stunde (DC-Reaktionskontrolle). Dann fügt man 4 ml 0,5 n Salzsäure hinzu und zieht die Suspension durch eine Glasfritte (4). Man wäscht den Rückstand zwei mal mit je 4 ml 0,5 n Salzsäure und anschließend zwei mal mit je 4 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung. Nach intensivem Nachspülen mit Wasser trocknet man bei Raumtemperatur am Ölpumpenvakuum und erhält Oxalsäurebis(2-benzoylanilid) als farblose, kristalline Substanz.

Ausbeute: 89 mg; 0,20 mmol, 78 %
Molekulargewicht 448,50 g/mol
Summenformel C₂₈H₂₀N₂O₄
DC (Kieselgel) FM = PE (40-70) / EE 5:1
 R_f = 0,39 (UV)
Elementaranalyse: Ber.: 75,0 % C, 4,5 % H, 6,2 % N.
 Gef.: 74,4 % C, 4,7 % H, 6,2 % N.

Massenspektrum (70eV):
 m/z = 448 (M⁺, 6 %) m/z = 146 (37 %)
 m/z = 224 (M²⁺ oder (M/2)⁺, 100 %) m/z = 105 (19 %)
 m/z = 197 (M/2 - HCN, 38 %) m/z = 77 (10 %)
 m/z = 196 (25 %)
 m/z = 167 (7 %)

GC/MS-Analytik Bedingungen:
 80 °C(4 min.) $\xrightarrow{25^\circ/\text{min}}$ 320 °C (16,4 min)
 R_t = 28,7 min.



$m/z = 448$ (M^+ , 3 %)

$m/z = 224$ (M^{2+} oder $(M/2)^+$, 100 %)

$m/z = 197$ ($M/2 - \text{HCN}$, 38 %)

$m/z = 196$ (25 %)

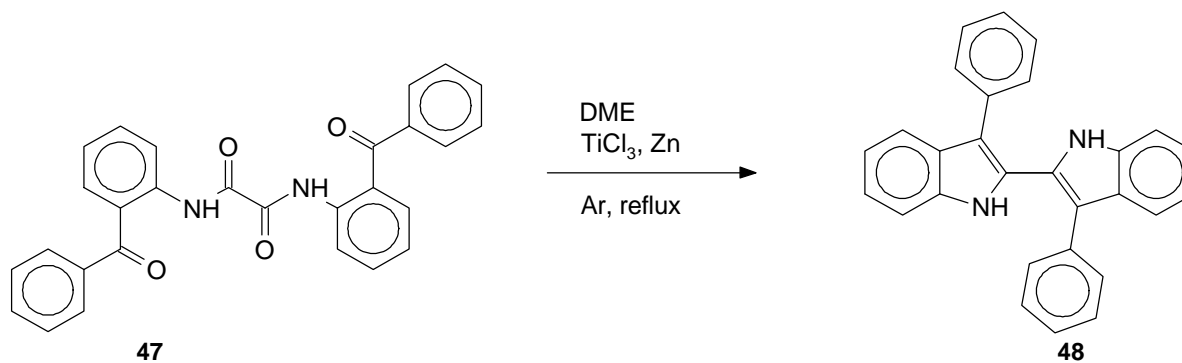
$m/z = 167$ (7 %)

$m/z = 146$ (37 %)

$m/z = 105$ (19 %)

$m/z = 77$ (10 %)

6.2.3.4 3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol (48)

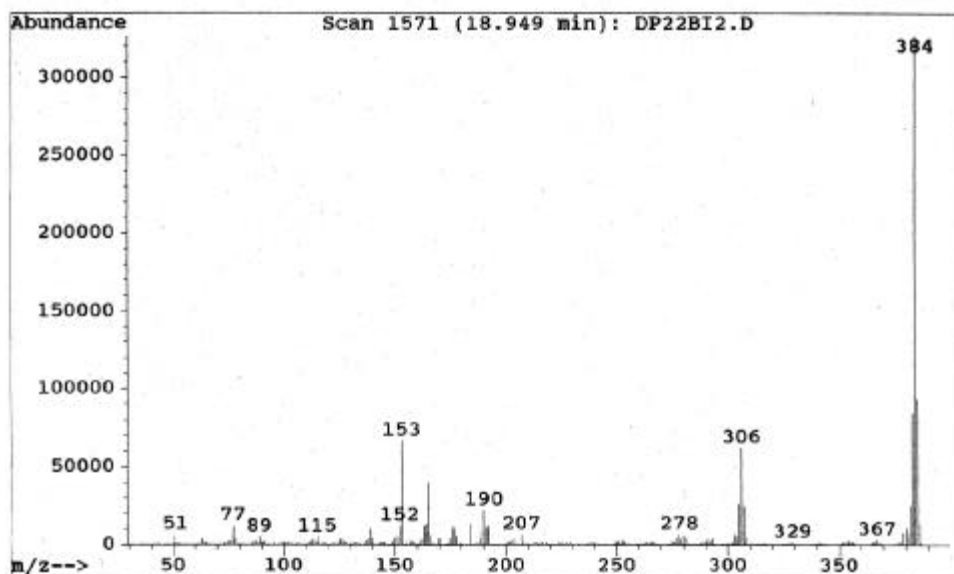
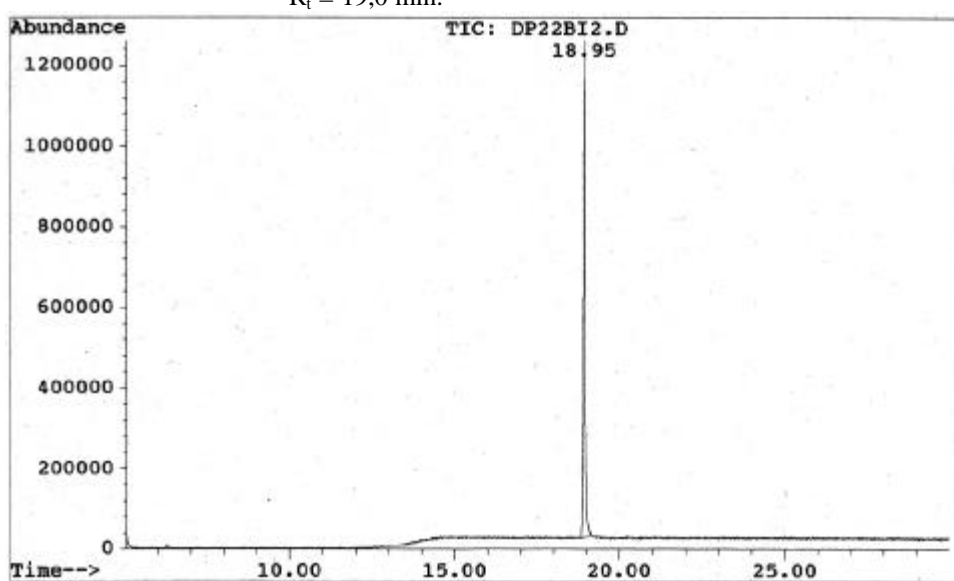


Die Reaktion wird unter Schutzgas mit getrockneten Lösungsmitteln nach einer Vorschrift von Fürstner et al. (1995) durchgeführt. 287 mg (4,39 mmol) Zinkstaub, 340 mg (2,2 mmol) Titantrichlorid und 215 mg (0,48 mmol) *N,N'*-Bis(2-benzoylphenyl)-oxamid (**47**) werden in 30 ml Dimethoxyethan suspendiert und unter Rühren zum Sieden erhitzt. Nach 3 Stunden Sieden läßt man auf Raumtemperatur abkühlen, filtriert über 1 g Kieselgel und spült mit 50 ml EE in kleinen Portionen nach.

Das einrotierte Filtrat wird an 4 g Kieselgel adsorbiert und an 45 g Kieselgel säulenchromatographisch von den Verunreinigungen abgetrennt; dabei dient ein Gemisch aus PE (40-70) / EE (5:1) als mobile Phase. Die nach Abziehen des Lösungsmittels erhaltene hellgelbe, kristalline Substanz wird in möglichst wenige EE gelöst und durch Zugabe des 4- bis 5-fachen Volumens an PE (40-70) oder n-Hexan und anschließendes Lagern über 1-2 Tage bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ausgefällt. 3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol (**46**) fällt als farblose, kristalline Substanz an.

| | |
|--------------------------|--|
| <u>Ausbeute:</u> | 103 mg, 0,268 mmol, 55,8 % |
| <u>Molekulargewicht:</u> | 384,48 g/mol |
| <u>Summenformel:</u> | $\text{C}_{28}\text{H}_{20}\text{N}_2$ |
| <u>DC (Kieselgel)</u> | FM = PE (40-70) / EE 5:1 $R_f = 0,50$ (UV) |
| <u>Elementaranalyse:</u> | Ber.: 87,5 % C, 5,2 % H, 7,3 % N. Gef.: 87,3 % C, 5,3 % H, 7,3 % N. |
| <u>GC/MS-Analytik</u> | Bedingungen: $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (4 min.) $\xrightarrow{25^{\circ}/\text{min}}$ $320\text{ }^{\circ}\text{C}$ (16,4 min) |

$R_t = 19,0$ min.



$m/z = 385$ (31 %)

$m/z = 384$ (M^+ , 100 %)

$m/z = 306$ (14 %)

$m/z = 192$ (M^{2+} oder $(M/2)^+$, 4 %)

$m/z = 153$ (13 %)

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum: CDCl_3 , 400,13 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm), $\vartheta = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$

^{13}C -NMR-Spektrum: CDCl_3 , 100,63 MHz; TMS als Standard (0,00 ppm), $\vartheta = 25\text{ }^\circ\text{C}$

6.3 Analysen

Elementaranalysen

Die CHN-Analysen wurden von Frau M. Alester, Birgit Dusch und Tatjana Schaible im Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern mit den Elementaranalysern 240 bzw. 2400 der Firma Perkin Elmer durchgeführt.

Gaschromatographie/Massenspektrometrie

Säule: 25m, HP 5, i.D. 0,25 mm, Schichtdicke: 0,25 μM fused silica column (Silicon mit 5 % Phenylmethyl-Gruppen), Trägergas: Helium

Gaschromatograph: Hewlett Packard, 5890 Series II Gaschromatograph

Massenspektrometer: Hewlett Packard, HP 5971A, mass selective detector

Massenspektren

Die Massenspektren wurden von Marion Schmitz und Sven Asmus im Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern mit dem Massenspektrometer Finnigan MAT 90 aufgenommen (Elektronenstoß, 70eV)

UV-Spektren

Varian Cary1 Bio UV Visible Spectrophotometer

NMR-Spektren

Die Spektren wurden von Frau H. Ruzek, Kerstin Schulte und Anja Müller im Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern aufgenommen. Die Angabe der chemischen Verschiebung erfolgt nach der δ -Skala in ppm, wobei eine Tieffeldverschiebung zum Standard TMS durch ein positives Vorzeichen gekennzeichnet ist. Die Spektren sind mit folgenden Geräten und Meßfrequenzen aufgenommen:

Bruker AMX 400: 400,13 MHz für ^1H -NMR-Spektren, 100,61 MHz für ^{13}C -NMR-Spektren

Bruker AC 200: 200,13 MHz für ^1H -NMR-Spektren.

6.4 Cyclovoltammetrie

Die cyclovoltammetrischen Untersuchungen wurden von Achim Elvers am Institut für Anorganische Chemie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg im Arbeitskreis von Prof. U. Zenneck durchgeführt.

Arbeitselektrode: Glas-Kohlenstoff-Elektrode (GC, *glass-carbon-electrode*)

Vergleichselektrode: Kalomelektrode

Lösungsmittel: Dimethylformamid

Leitsalz: Tetra-*n*-butylammoniumhexafluorophosphat (0,1 M)

Meßbereich: -1,5 bis +1,75 V

Stromstärke: 500 μA - 1 mA

Vorschubgeschwindigkeiten: 100 mV/sec

6.5 Ethidiumbromidverdrängungsassay

Fluoreszenzspektrometer: Perkin Elmer LS-5 Luminescence Spectrometer

Lösungen und Puffer: Pufferlösung (pH = 7): 9,3 mmol NaCl; 2,0 mmol Natriumacetat; 0,10 mmol EDTA

Kalbsthymus-DNA: 10 mg Kalbsthymus-DNA (Boehringer Mannheim) auf 3,8 ml Wasser

Ethidiumbromidpuffer: Ethidiumbromidstammlösung (Sigma) 10 mg/ml (entspricht 25 μM); Endkonzentration im Puffer: 2 μM

Durchführung: Das Fluoreszenzspektrometer wird auf die Wellenlänge 546 nm (Ex.) und 595 nm (Em) eingestellt und mit 2 ml Ethidiumbromidpuffer in einer Fluoreszenzküvette geblenkt. Man mißt die Fluoreszenzintensität von 2 ml eines Gemischs aus 6 ml Ethidiumbromidpuffer und 20 μl DNA-Lösung. Diese Fluoreszenzintensität wird als 100 % gesetzt. Man gibt zu den 2 ml Lösung in der Meßküvette sukzessive Substanz (in DMSO gelöst) zu und mißt die Veränderungen der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Substanzkonzentration (vergrößertes Volumen wird einberechnet). Die mögliche Eigenfluoreszenz der Substanzen wird an entsprechend konzentrierten Lösungen der Substanz in Ethidiumbromidpuffer ohne DNA bestimmt und im Falle eines meßbaren Effekts von der beobachteten Fluoreszenzintensität mit DNA subtrahiert. Zur Positivkontrolle dient Doxorubicin, zur Negativkontrolle DMSO ohne Substanz. Bei ED_{50} -Werten unter 10 μM wird eine Doppelbestimmung durchgeführt.

6.6 Enzyme des Zellzyklus

Die Untersuchungen zur Hemmung von Enzymen des Zellzyklus wurden von Sophie Leclerc in der Arbeitsgruppe von Dr. Laurent Meijer, am Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Station Biologique, Roscoff, Frankreich durchgeführt.

Der Enzymkomplex CDK1/Cyclin B wurde aus Eizellen des Seesterns (*Marthasterias glacialis*), die sich in der M-Phase befanden durch Affinitätschromatographie an $\text{p9}^{\text{CKShs1}}$ auf Sepharose als Trägermatrix gewonnen. Die Elution erfolgte durch freies $\text{p9}^{\text{CKShs1}}$.

Getestet wurde mit 1 mg Histon H1 (Sigma Typ III-S) / ml in Gegenwart von 15 μM [γ - ^{32}P]-ATP (3000 Ci / mmol; 1 mCi / ml) in einem Endvolumen von 30 μl . Nach 10 min Inkubation bei 30 °C wurden 25 μl -Aliquote auf 2,5 x 3 cm-Stückchen Whatman P81 Phosphocellulose-Papier getüpfelt, und nach 20 sek wurden die Filterstückchen 5 mal in einer Lösung von 10 ml Phosphorsäure pro Liter Wasser gewaschen (für jeweils mindestens 5 min). Die feuchten Filterstückchen wurden in 6 ml-Kunststoff-Szintillationsröhrchen überführt, dazu wurde 5 ml ACS (Amersham) Szintillationscocktail gegeben und die Aktivität in einem Packard-Szintillationszähler bestimmt. Die Phosphorylierungsaktivität der Kinase wurde in pmol Phosphat, das in Histon H1 pro 10 min Inkubation eingebaut wurde oder in Prozent der maximalen Aktivität ausgedrückt.

Die cdc25-Phosphatase wird durch Expression des rekombinanten Glutathion-S-Transferase/cdc25-Fusionsproteins in *Escherichia coli* gewonnen und durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose aufgereinigt. Die cdc25-Aktivität wird über eine Farbreaktion bestimmt, die durch die Hydrolyse von *p*-Nitrophenylphosphat eintritt.

Der Enzymkomplex CDK2/Cyclin A wurde in Sf9-Insekten-Zellen exprimiert. Die CDK2/Cyclin A-Aktivität wurde analog zu CDK1/Cyclin B über die Phosphorylierung von Histon H1 bestimmt.

6.7 Colony-Forming-Assay

Die Colony-Forming-Assays wurden von Dr. Thomas Roth bei Oncotest GmbH, Freiburg durchgeführt.

Zum Colony-Forming-Assay (Fiebig und Berger, 1992; Fiebig et al., 1987) werden humane Tumorxenografts, die in Serienpassagen in thymusaplastischen Nacktmäusen wachsen, entnommen und mechanisch zerkleinert. Aus den Tumorstückchen wird durch Inkubation mit Enzymcocktail und Abfiltrieren durch Sieben verschiedener Porengröße eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen werden dann in 0,3 %igem Agar suspendiert und in 24-Loch-Platten, die bereits 0,3 ml einer 0,7 %igen Agarlösung enthalten, gegeben. Nach einem Tag Inkubation bei 37 °C im Inkubator werden 0,2 ml der jeweiligen Substanzlösung zugegeben. Jede Platte enthält 6 Näpfe mit Kontrollansätzen und je 3 Näpfe für jede der 6 verschiedenen Substanzkonzentrationen. Die Platten werden zur Ausbildung der Kolonien aus den Tumorstammzellen für 6-16 Tage inkubiert. Die Inkubationszeit richtet sich

nach der Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Tumorstammzellen. Durch Vergleich der Anzahl der Kolonien in der unbehandelten Kontrolle und den mit Substanz behandelten Wells, werden die T/C-Werte (*test-versus-control-group value* = Anzahl der Kolonien in der behandelten Gruppe x 100 / Anzahl der Kolonien in der Kontrollgruppe), sowie IC₅₀-, IC₇₀-, und IC₉₀-Werte berechnet.

Die IC₇₀-Mittelwerte werden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Mittelwert}(IC_{70}) = 10^{\frac{\sum_{i=1}^n \log(IC_{70})_i}{n}}$$

i = spezifische Tumorzelllinie; n = Gesamtzahl der untersuchten Zelllinien;

wenn kein IC₇₀-Wert bestimmt werden kann, weil die Zelllinie zu empfindlich oder zu unempfindlich reagiert, wird die niedrigste bzw. höchste verwendete Substanzkonzentration für die Berechnung eingesetzt.

6.8 Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten, Lipophilie-Wirkungs-Abhängigkeit

Die Messungen zum Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten wurden in Zusammenarbeit mit Wolfgang Petry durchgeführt.

6.8.1 Geräte und Einstellungen

HPLC-System: HPLC-Pumpe: Jasco PU 980

Gradientenmischer: Jasco LG-980-02

Entgaser: Jasco DG-980-50

HPLC-Säule: Merck, LichroCART, 125-4, RP-18 ec, mit Vorsäule

Detektor (UV): GAT LCD-500, rise time: 0,3 sec., Range (AUFS, Absorption Units Full Scale): 0,005, $\lambda = 292$ nm.

Integrator: Shimadzu C-R3A

Einstellungen:

| | | | |
|----------|------|----------|--------|
| WIDTH | 5 | SLOPE | 152,64 |
| DRIFT | 0 | MIN.AREA | 100 |
| T.DBL | 1000 | STOP:TM | 15 |
| ATTEN | 1 | SPEED | 4 |
| METHOD\$ | 0021 | FORMAT\$ | 0 |
| SPL.WT | 0 | IS.WT | 1 |

Fließmittel, Substanzen (R_t):

65 % Methanol / 35 % Wasser, Indirubin-5-sulfonsäuremethylamid (**75**) (3,3 min), Indirubin-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid (**77**) (5,7 min), Indirubin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid (**82**) (2,4 min), Indirubin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid (**86**) (2,6 min)

75 % Methanol / 25 % Wasser, Indirubin (**11**) (5,4 min), 5-Iodindirubin (**90**) (9,4 min), 5-Bromindirubin (**31**) (9,5 min), 5-Chlorindirubin (**33**) (9,0 min), 5-Fluorindirubin (**62**) (5,9 min), 5-Methylindirubin (**36**) (7,3 min), 5-Nitroindirubin (**65**)

(5,1 min), 1-Methylindirubin (**25**) (11,6 min), Indigo (**12**) (4,0 min), Isoindigo (**13**) (2,6 min)

85 % Methanol / 15 % Wasser, Indirubin-3'-oxim (**87**) (2,1 min), 5-Iodindirubin-3'-oxim (**91**) (3,4 min)

90 % Methanol / 10 % Wasser, 5'-Bromindirubin (**67**) (3,0 min), 5,5'-Dibromindirubin (**68**) (3,5 min), 6-Iodindirubin (2,9 min)

80 % Acetonitril / 20 % Wasser, Indirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (**29b**) (0,9), 5'-Bromindirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (**69a**) (0,9 min), 3'-Hydroxyiminoindirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (**92**) (0,9 min)

Flow: 1 ml/min

6.8.2 Phosphatpuffer

19,7 Teile einer Kaliumdihydrogenphosphatlösung (KH_2PO_4 : 9,08 g/l) und 80,3 Teilen einer Dinatriumhydrogenphosphatlösung (Na_2HPO_4 : 9,48 g/l) werden vereinigt und die entstehende Lösung 1:10 mit Wasser verdünnt. Der pH-Wert beträgt 7,4.

6.8.3 Ausschütteln

750 μl der jeweils gesättigten Lösungen in Octanol werden mit 750 μl Phosphatpuffer 5 min kräftig geschüttelt. Nach der Phasentrennung wird die wäßrige Phase entweder direkt der Gehaltsbestimmung zugeführt oder bei zu konzentrierten Lösungen mit Methanol geeignet verdünnt. Die Octanollösung wird in jedem Fall vor dem Vermessen 1 : 10 mit Methanol verdünnt und gegebenenfalls geeignet weiter verdünnt.

Bei den Natriumsalzen von Indirubin-5-sulfonsäure und 5'-Bromindirubin-5-sulfonsäure (**69a**) wird folgendermaßen vorgegangen:

6.8.4 Ausschütteln bei Indirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (**29b**) und 5'-Bromindirubin-5-sulfonsäure (Natriumsalz) (**69a**)

750 μl der jeweils gesättigten Lösungen in 0,01 M Phosphatpuffer werden mit 750 μl Octanol 5 min kräftig geschüttelt. Nach der Phasentrennung wird die wäßrige Phase mit Methanol geeignet verdünnt.

6.8.5 Gehaltsbestimmung

Die Quantifizierung erfolgt über die Flächen der Peaks bei isokratischer Elution.

Für jede Substanz wird eine Eichreihe mit jeweils vier Meßpunkten so bestimmt, daß die Flächenwerte der Gehaltsbestimmungen sich innerhalb des durch die Eichgeraden abgedeckten Konzentrationsbereichs befinden.

Jeweils vor der ersten Messung jeder Eichreihe und jeweils vor und nach der Bestimmung der Konzentration der wäßrigen und jeweils vor und nach der Bestimmung der Konzentration der octanolischen Phase wird als Blindwert Pufferlösung eingespritzt, um Memoryeffekte auszuschließen. Vor Beginn der Messung einer weiteren Substanz wird ein Methanol-Blindwert eingespritzt.

Die Abschätzung der unteren Nachweisgrenzen erfolgt über die Peakhöhen.

6.8.6 Berechnung des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten

Der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient, $\log P_{OW}$ ist der Quotient aus der Konzentration in Octanol und der Konzentration in Wasser. Angegeben wird der dekadische Logarithmus dieses Quotienten.

$$\log P_{OW} = \log \frac{C_{Octanol}}{C_{Wasser}}$$

6.8.7 Lipophilie-Wirkungs-Abhängigkeit

Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem Programm Origin, Version 5.0 der Firma Microcal.

Die Meßpunkte werden mit einem Polynom 2. Grades angenähert:

$$\log IC_{70} = -a (\log P_{OW})^2 + b \log P_{OW} + c$$

der Fehlerbereich gibt das 95 %-Vertrauensintervall an.

r: Korrelationskoeffizient

r²: Maß für die Qualität des Modells

SD: Standardabweichung

N: Anzahl der Meßpunkte

p: Irrtumswahrscheinlichkeit (Wahrscheinlichkeit, daß r = 0, also das Modell falsch ist)

6.9 Sulforhodamin B-Assay

Der Sulforhodamin B-Assay wurde von Elke Litmianski, Ellen Niederberger, Wolfgang Petry und Simone Schätzle durchgeführt.

Die Inkubation findet auf 24-Lochplatten statt. Die Zelleinsaat beträgt 4000 Zellen/ml und die Inkubationsdauer drei Tage. Durch Zugabe von 250 µl auf 4 °C temperierter 50 %iger TCA-Lösung (Endkonzentration 10 %) wird die Inkubation abgebrochen und die Platten eine Stunde im Kühlschrank belassen. Die Platten werden danach viermal mit Leitungswasser gewaschen und über Nacht getrocknet. Zur Färbung sind 250 µl 0,4 %iger Sulforhodamin-B-Lösung (in 1 %iger Essigsäure) zu pipettieren; die Färbung erfolgt für 30 min bei Raumtemperatur, worauf die Platten mit 1 %iger Essigsäure viermal gewaschen und dann über Nacht an einem dunklen Ort getrocknet werden. Der an die zellulären Proteine gebundene Farbstoff solubilisiert durch Zugabe von jeweils 1000 µl auf 4 °C temperierten Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH = 10,5). Die frische Farbstofflösung wird in Einwegküvetten überführt und die Extinktionswerte im Absorptionsmaximum des SRB bei 564 nm im UV/vis-Spektrometer gegen einen Blindwert bestimmt. Übersteigt die Extinktion dabei einen Wert von 1,5, werden die Lösungen mittels Tris/HCl-Puffer soweit verdünnt, bis sich der ergebende Extinktionswert im linearen Bereich des Photometers befindet. Die zur Auswertung definierten OD-Einheiten berechnen sich dabei als Produkt aus den bestimmten Extinktionswerten und den dazugehörigen Verdünnungsfaktoren (Skehan et al, 1990).

6.10 *In vivo*-Untersuchungen

Die *in vivo*-Untersuchungen an thymusaplastischen Nacktmäusen wurde von Dr. Thomas Roth bei Oncotest GmbH, Freiburg durchgeführt.

6.11 Röntgenstrukturanalytische Untersuchungen an CDK2

Die Kristallisation sowie die Messung und Interpretation der Daten wurden von Dr. Jane Endicott an der Universität von Oxford (Großbritannien) durchgeführt.

Humane CDK2 wurde in Sf900-Insekten-Zellen unter Verwendung eines rekombinanten Baculovirus, der für CDK2 kodiert, exprimiert. Aufreinigung und Kristallisation erfolgten nach Rosenblatt et al. (1993) und Brown et al. (1998). Zum Kristall in der Mutterlauge wurde Hemmstoff gegeben und so ein Eindiffundieren in die Kristallstruktur ermöglicht. Zum genauen Vorgehen und zur Statistik der Datensets siehe Hoessel et al. (1999).

7 Literaturverzeichnis

- Abraham RT, Acquarone M, Andersen A, Aseni A, Bellé R, Berger F, Bergounioux C, Brunn G, Buquet-Fagot C, Fagot D, Glab N, Goudeau H, Goudeau M, Guerrier P, Houghton P, Hendriks H, Kloareg B, Lippai M, Marie D, Maro B, Meijer L, Mester J, Mulner-Lorillon O, Poulet SA, Schierenberg E, Schutte B, Vaultot D (1995) Cellular effects of olomoucine, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Biologie Cellulaire* 83, 105-120
- Ainley AD, Robinson R (1934) The Epindoline Group. Part I. Trial of Various Methods for the Synthesis of Epindolidiones. *Journal of the Chemical Society* 101, 1508-1516
- Albert A (1915) Thioindol-Derivate. Eine Synthese des Indirubins. Schwefelhaltige indigoide Farbstoffe I. *Chemische Berichte* 48, 474-83
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1995) *Molekularbiologie der Zelle*. 3. Aufl., Weinheim: VCH
- Alessandrini AT, Chiaur DS, Pagano M (1997) Regulation of the cyclin dependent kinase inhibitor p27 by degradation and phosphorylation. *Leukemia* 11 (3), 342-5
- Arakawa H, Iguchi T, Morita M, Yoshinari T, Kojiri K, Suda H, Okura A, Nishimura S (1995) Novel Indolocarbazole Compound 6-N-Formylamino-12,13-dihydro-1,11-dihydroxy-13-(beta-D-glucopyranosyl)-5H-indolo[2,3-a]pyrrolo-[3,4-c]carbazole-5,7(6H)-dione (NB-506): Its Potent Antitumor Activities in Mice. *Cancer Research* 55, 1316-20
- Arnold WN (1996) King George III's urine and indigo blue. *The Lancet* 347, 1811-3
- Azzi L, Meijer L, Ostvold AC, Lew J, Wang JH (1994) Purification of a 15-kDa cdk4- and cdk5-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* 269 (18), 13279-88
- Baeyer A, Knop CA (1866) Untersuchungen über die Gruppe des Indigblau's. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 140, 1-38
- Baeyer A, Emmerling A (1870) Reduction des Isatins zu Indigblau. *Chemische Berichte* 3, 514-7
- Baeyer A (1878 a) Synthese des Oxindols. *Chemische Berichte* 11, 582-4
- Baeyer A (1878 b) Synthese des Isatins und Indigblaus. *Chemische Berichte* 11, 1228-9
- Baeyer A (1878 c) Synthese des Indigblaus. *Chemische Berichte* 11, 1296-7
- Baeyer A (1879) Ueber die Einwirkung des Fünffachchlorphosphors auf Isatin und auf verwandte Substanzen. *Chemische Berichte* 12, 456-61
- Baeyer A (1880) Ueber die Beziehung der Zimmtsäure zu der Indigogruppe. *Chemische Berichte* 13, 2254-63
- Baeyer A (1881) Ueber die Verbindungen der Indigogruppe. *Chemische Berichte* 14, 1741-50
- Baratte B, Meijer L, Galaktionov K, Beach D (1992) Screening for Antimitotic Compounds Using the cdc25 Tyrosine Phosphatase, an Activator of the Mitosis-Inducing p34cdc2/Cyclin Bcdc13 Protein Kinase. *Anticancer Research* 12, 873-880

- Barnekow A, Paul E, Scharl M (1987) Expression of the c-src protooncogene in human skin tumors. *Cancer Research* 47 (1), 235-40
- BASF (1899) Patentschriften: DRP 117924 und 136779
- BASF (1900) Patentschriften: DRP 136779 und 129562
- Bauer H (1967) Dimere Oxydationsprodukte aus alpha-Äthoxy-pyrrol-Derivaten. *Chemische Berichte* 100, 1701-3
- Baumann E, Tiemann F (1879) Zur Constitution des Indigos. *Chemische Berichte* 12, 1098-1104
- Bechthold T, Burtscher E, Gmeiner D, Bobleter O (1991) The redox-catalysed reduction of dispersed organic compounds. Investigation on the electrochemical reduction of insoluble organic compounds in aqueous systems. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 306, 169-83
- Berens U, Brown JM, Long J, Selke R (1996) Synthesis and Resolution of 2,2'-bis diphenylphosphino[3,3']biindolyl; a new Atropisomeric Ligand for Transition Metal Catalysis. *Tetrahedron, Asymmetry* 7 (1), 285-92
- Bergman J (1968) Deselenation and the Mass Spectra of 3,3'-Di-indolyl Selenides. *Acta Chemica Scandinavica* 22, 1883-7
- Bergman J (1971) Synthesis of 3-Substituted Indoles Starting from Isatin. *Acta Chemica Scandinavica* 25, 1277-80
- Bergman J (1973) Synthesis of 2,3'-Biindolyl from Indole in One-step Reactions. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 10 (1), 121-2
- Bergman J, Eklund N (1980) Synthesis of 2,2'-Biindolyls by coupling reactions. *Tetrahedron* 36, 1439-43
- Bergman J, Stallhandske C (1994) Transformation of Isatin with P4O10 to Pentathiepino[6,7-b]indole in One Step. *Tetrahedron Letters* 35 (29), 5279-82
- Bergman J, Koch E, Pelcman B (1995) 2,2'-Biindolyl Revisited. Synthesis and Reactions. *Tetrahedron* 51 (19), 5631-42
- Berkeley C (1961) Indigotin Content of Woad. *Nature* 191 (4796), 1414-5
- Bischoff JR, Friedman PN, Marshak DR, Prives C, Beach D (1990) Human p53 is phosphorylated by p60-cdc2 and cyclin B-cdc2. *Proceedings of the National Academie of Sciences of the USA* 87 (12), 4766-70
- Black DStC, Vanderzalm CHB, Wong LCH (1982) Metal Template Reactions. XIV Synthesis of Maacrocyclic Metal Complexes from 2,2'-(Oxalyldiimino)bisbenzaldehyde and related Oxamido Aldehydes and Ketones. *Australian Journal of Chemistry* 35, 2435-43
- Black DSC, Kumar N (1984) A General Strategy for the Synthesis of 2,2'-, 2,3'-, and 2,7'-Bi-indolyls. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 441-2
- Bocchi V, Palla G (1984) Synthesis and spectroscopic characteristics of 2,3'-Biindolyls and 2,2'-indolylpyrroles. *Tetrahedron* 40 (17), 3251-6

- Böck A (1999) Struktur und Biosynthese von Organo-Selen-Verbindungen. Homepage von Prof. Dr. August Böck, Institut für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, <http://www.zi.biologie.uni-muenchen.de/science/SFB369/tpa3.htm>
- Böhm H.-J., Klebe G, Kubinyi H (1996) Wirkstoffdesign. 1. Aufl., Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag
- Bojanowski K, Nishio K, Fukuda M, Larsen AK, Saijo N (1994) Effect of suramin on p34cdc2 kinase in vitro and in extracts from human H69 cells: evidence for a double mechanism of action. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 203 (3), 1574-80
- Borgne A, Meijer L (1996) Sequential Dephosphorylation of p34cdc2 on Thr-14 and Tyr-15 at the Prophase/Metaphase Transition. *Journal of Biological Chemistry* 271 (44), 27847-54
- Borsche W, Weußmann H, Fritzsche A (1924) Untersuchungen über Isatin und verwandte Verbindungen, VI: Über 5-Jod-isatin und 5,5'-Dijod-indigo. *Chemische Berichte* 57, 1770-5
- Boyd MR, Paull KD (1995) Research Overview: Some Practical Considerations and Applications of the National Cancer Institute In Vitro Anticancer Drug Discovery Screen. *Drug Development Research* 34, 91-109
- Bradshaw D, Hill CH, Nixon JS, Wilkinson SE (1993) Therapeutic potential of protein kinase C inhibitors. *Agents Actions* 38 (1-2), 135-47
- Britten AZ, Smith GF (1972) Autoxidation of 3,3'-Dimethyl-2,2'-bi-indolyl. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions I* 3, 418-20
- Brooks EE, Gray NS, Joly A, Kerwar SS, Lum R, Mackman RL, Norman TC, Rosete J, Rowe M, Schow SR, Schultz PG, Wang X, Wick MM, Shiffman D (1997) CVT-313, a specific and potent inhibitor of CDK2 that prevents neointimal proliferation. *Journal of Biological Chemistry* 272 (46), 29207-11
- Brown NR, Noble MEM, Lawrie AM, Morris MC, Tunnah P, Divita G, Johnson LN, Endicott JA (1999) Effects of phosphorylation of threonine 160 on CDK2 structure and activity. *Journal of Biological Chemistry* in Druck
- Bush JA, Long BH, Catino JJ, Bradner WT (1987) Production and biological activity of rebeccamycin, a novel antitumor agent. *Journal of Antibiotics* 40 (5), 668-78
- Buu-Hoi NP, Saint-Ruf G (1968) La thermolyse de l'azine de l'isatine avec formation d'isoindigo. *Bulletin de la Société Chimique de France* 12, 5035-6
- Capuano L, Drescher S, Hammerer V, Hanisch M (1988) Neue Heterocyclensynthesen durch Wittig-Reaktion, II 2,2'-Biindolyle; 1,2-Di(2-indolyl)- und 1,2-Di(1-benzofuran-2-yl)ethylene. *Chemische Berichte* 121, 2259-61
- Cartwright CA, Meisler AI, Eckhart W (1990) Activation of the pp60-srcprotein kinase is an early event in colonic carcinogenesis. *Proceeding of the National Academie of Sciences of the USA* 87 (2), 558-62
- Chackalaparampil I, Shalloway D (1988) Altered phopsphorylation and activation of pp60c-src during fibroblast mitosis. *Cell* 52 (6), 801-10
- Chang CN (Hrsg.) (Hrsg.) (1985) Anti-leukemia chinese herbs and the effective Ingredients. *Advances in Chinese Medicinal Materials Research, International Symposium Singapur: World Sci.*, 369-75

- Chinesische Pharmakopöe (1995) Vol. 1
- Chovin P (1944) Recherches sur les lactones colorées. Isooxindigo et benzonaphthyrones. Bulletin de la Société Chimique de France 5 (11), 82-90
- Coleman TR, Dunphy WG (1994) Cdc2 regulatory factors. Current Opinion in Cell Biology 6 (6), 877-82
- Coleman KG, Lyssikatos JP, Yang BV (1997) Chemical inhibitors of Cyclin-dependent Kinases. Annual Reports in Medicinal Chemistry 32, 171-179
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. Acta Crystallographica 50, 760-3
- Connolly ML (1983) Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids. Science 221 (4612), 709-13
- Connolly ML (1985) Molecular Surface Triangulation. Journal of Applied Chemistry 18, 499-505
- Cordon-Cardo C (1995) Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. American Journal of Pathology 147 (3), 545-60
- De Azevedo WF Jr, Mueller-Dieckmann HJ, Schulze-Gahmen U, Worland PJ, Sausville E, Kim SH (1996) Structural basis for specificity and potency of a flavonoid inhibitor of human CDK2, a cell cycle kinase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 93 (7), 2735-40
- De Azevedo WF, LeClerc S, Meijer L, Havlíček L, Strnad M, Kim SH (1997) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. Crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. European Journal of Biochemistry 243, 518-526
- De Bondt HL, Rosenblatt J, Jancarik J, Jones HD, Morgan DO, Kim SH (1993) Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. Nature 363, 595-602
- Dealler SF, Hawkey PM, Millar MR (1988) Enzymatic degradation of urinary indoxyl sulfate by *Providencia stuartii* and *Klebsiella pneumoniae* causes the purple urine bag syndrome. Journal of Clinical Microbiology 26 (10), 2152-6
- Drees M, Dengler WA, Roth T, Labonte H, Mayo J, Malspeis L, Grever M, Sausville EA, Fiebig HH (1997) Flavopiridol (L86-8275): a selective antitumor activity in vitro and activity in vivo for prostate carcinoma cell. Clinical Cancer Research 3, 273-9
- Drosdowski G (Hrsg.), Köster R (Hrsg.), Müller W, Scolze-Stubenrecht W (1963) Duden, Band 7: Etymologie, Herkunftswörterbuch der deutschen Sprache. Mannheim: Dudenverlag
- Du D, Ceng Q (1981) Effect of indirubin on the incorporation of isotope labeled precursors into nucleic acid and protein of tumor tissues. Chinese Traditional Herb Drugs 12, 406-9
- Du D, Ceng Q, Wen Z, Wan X (1982) Study on the incorporation of [3H]TdR into DNA of liver and spleen of L7212, a lymphatic leukemia of mice. Zhonghua Xueyexue Zazhi 3 (5), 277-80
- Du D, Zeng Q, Si X, Ran C, Wang X (1991) Antitumor activities of 5'-iodo-indirubin in: Recent advances of chemistry and molecular biology in cancer research, Int. Symp., Beijing, July, 23. - 26. 1991. Recent Advances of Chemistry and Molecular Biology in Cancer Research, 345-50
- Egan EA, Solomon MJ (1998) Cyclin-stimulated binding of Cks proteins to cyclin-dependent kinases. Molecular and Cellular Biology 18 (7), 3659-67

- Einhorn A (1883) Ueber Derivate der Orthonitrozimmtsäure. *Chemische Berichte* 16, 2208-16
- Einolf HJ, Amin S, Yagi H, Jerina DM, Baird WM (1996) Benzo[c]phenanthrene is activated to DNA-binding diol epoxides in the human mammary carcinoma cell line MCF-7 but only limited activation occurs in mouse skin. *Carcinogenesis* 17 (10), 2237-44
- Elledge SJ, Winston J, Harper JW (1996) A question of balance: the role of cyclin-kinase inhibitors in development and tumorigenesis. *Trends in Cell Biology* 6, 388-92
- Emmerling A, Engler C (1870) Die Synthese des Indigblau's. *Chemische Berichte* 3, 885-92
- Ensley BD, Gibson DT, Laborde AL (1982) Oxidation of Naphthalene by a Multicomponent Enzyme System from *Pseudomonas* sp. Strain NCIB 9816. *Journal of Bacteriology* 149 (3), 948-54
- Ensley BD, Ratzkin BJ, Osslund TD, Simon MJ (1983) Expression of Naphthalene Oxidation Genes in *Escherichia coli* Results in the Biosynthesis of Indigo. *Science* 222, 167-9
- Epstein E, Nabors MW, Stowe BB (1967) Origin of Indigo of Woad. *Nature* 216, 547-9
- Evans DH (1977) Voltammetry: Doing Chemistry with Electrodes. *Accounts of Chemical Research* 10 (9), 313-9
- Fabbro D (1996) Protein kinase inhibitors: a potential therapeutic modality for the treatment of cancer? *Annals of Oncology* 7 (Suppl 1), 27
- Fabre S, Prudhomme M, Rapp M (1993) Protein Kinase C Inhibitors; Structure-Activity Relationships in K252c-Related Compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 1 (3), 193-6
- Fabre S, Prudhomme M, Sancelme M, Rapp M (1994) Indolocarbazole Protein Kinase C Inhibitors from Rebecamycin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2 (2), 73-7
- Falbe J (Hrsg.), Regitz M (Hrsg.) (1992) *Römpp Chemie Lexikon*. 9. Aufl., Stuttgart: Georg Thieme Verlag
- Farbwerke vorm. Meister Lucius & Brüning (1913) Verfahren zur Darstellung von Derivaten der Indirubine. Patentschrift: DRP 283726
- Fellous A, Kubelka M, Thibier C, Taieb F, Haccard O, Jesus C (1994) Association of p34cdc2 kinase and MAP kinase with microtubules during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *International Journal of Developmental Biology* 38 (4), 651-9
- Fiebig HH, Schmid JR, Bieser W, Henss H, Lohr GW (1987) Colony Assay with Human Tumor Xenografts, Murine Tumors and Human Bone Marrow. Potential for Anticancer Drug Development. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 23 (7), 937-48
- Fiebig HH, Berger DP, Dengler WA, Wallbrecher E, Winterhalter BR (1992) Combined In Vitro/In Vivo Test Procedure with Human Tumor Xenografts for New Drug Development. *Contributions to Oncology*. Basel: Karger 42, 321-51
- Fisher DE (1994) Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 78 (4), 539-42
- Flimm W (1890) Synthese von Indigo aus Monobromacetanilid. *Chemische Berichte* 23, 57-60
- Fouquet H, Bielig H-J (1971) Biologische Vorstufen und Genese von antikem Purpur. *Angewandte Chemie* 83 (21), 856-7

- Freireich EJ, Gehan EA, Rall DP, Schmidt LH, Skipper HE (1966) Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemotherapy Reports* 50 (4), 219-44
- Friedländer P, Kunz K (1922) Über N,N'-Diphenyl-indigo. *Chemische Berichte* 55, 1597-1097
- Friedländer P, Sander L (1924) Über die Aufspaltung indigoide Farbstoffe durch Alkalien. *Chemische Berichte* 57, 648-52
- Fry AJ (1972) *Synthetic Organic Electrochemistry*. New York: Harper & Row
- Fürstner A, Hupperts A, Ptock A, Janssen E (1994) "Site Selective" Formation of Low-Valent Titanium Reagents: An "Instant" Procedure for the Reductive Coupling of Oxo Amides to Indoles. *Journal of Organic Chemistry* 59, 5215-29
- Fürstner A, Ptock A, Weintritt H, Goddard R, Krüger C (1995) Titaninduzierte Zipper-Reaktionen. *Angewandte Chemie* 107 (6), 725-8
- Gadbois DM, Hamaguchi JR, Swank RA, Bradbury EM (1992) Staurosporine is a potent inhibitor of p34cdc2 and p34cdc2-like kinases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 184 (1), 80-5
- Gan W, Yang T, Wen S, Liu Y, Tan Z, Deng C, Wu J, Liu W (1985) Studies on the mechanism of indirubin action in treatment of chronic myelocytic leukemia (CML). II. 5'-Nucleotidase in the peripheral white blood cells of CML. *Zhonghua Xueyexue Zazhi* 6 (10), 611-3
- Gan W-J, Yong Z-C, Qian Z-C, Ma J, Ge Y-Q, Cheng B-J, Li Z-M, Bo H-Q (1987) Studies on the mechanism of indirubin by treatment of chronic myelocytic leukemia. *Chinese Biochemical Journal* 3 (3), 225-30
- Garcia R, Parikh HU, Saya H, Gallick GE (1991) Effect of herbimycin A on growth and pp60c-src activity in human colon tumor cell lines. *Oncogene* 6 (11), 1983-9
- Gelius R (1980) Zur Kenntnis des Waidindigos. *Zeitschrift für Chemie* 20, 340-1
- Gescher A (1995) Modulators of signal transduction as cancer chemotherapeutic agents--novel mechanisms and toxicities. *Toxicological Letters* 82-83, 159-65
- Gevekoht H (1883) Darstellung der drei Nitroactophenone. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 221, 323-35
- Geyer H, Scheunert I, Korte F (1986) Bioconcentration Potential of Organic Environmental Chemicals in Humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 6, 313-47
- Giovannini E, Lorenz T (1957 a) Reduktion mit LiAlH₄ in der Isatin-Reihe. 1. Mitteilung. Über Darstellung und Eigenschaften von 3-Hydroxy-indolin. *Helvetica Chimica Acta* 40, 1555-61
- Giovannini E, Lorenz T (1957 b) Reduktion mit LiAlH₄ in der Isatin-Reihe. 2. Mitteilung. Einwirkung von LiAlH₄ auf Indol- und Isatin-Derivate. *Helvetica Chimica Acta* 40, 2287-91
- Giulivi C, Cadenas E (1998) Extracellular activation of fluorinated aziridinylbenzoquinone in HT29 cells EPR studies. *Chemico-biological Interactions* 113 (3), 191-204
- Glover DM, Ohkura H, Tavares A (1996) Polo kinase: the choreographer of the mitotic stage? *Journal of Cell Biology* 135 (6 Pt 2), 1681-4

- Gottardis MM, Jordan VC (1988) Development of tamoxifen-stimulated growth of MCF-7 tumors in athymic mice after long-term antiestrogen administration. *Cancer Research* 48 (18), 5183-7
- Gray NS, Wodicka L, Thunnissen AM, Norman TC, Kwon S, Espinoza FH, Morgan DO, Barnes G, LeClerc S, Meijer L, Kim SH, Lockhart DJ, Schultz PG (1998) Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science* 281 (5376), 533-8
- Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*
- Groshong SD, Owen GI, Grimison B, Schauer IE, Todd MC, Langan TA, Sclafani RA, Lange CA, Horwitz KB (1997) Biphasic regulation of breast cancer cell growth by progesterone: role of the cyclin-dependent kinase inhibitors, p21 and p27(Kip1). *Mol. Endocrinol.* 11 (11), 1593-607
- Grossman SA (1998) Phase II Study of Suramin for Recurrent or Progressive Malignant Glioma. <http://cancernet.nci.nih.gov/prot/docs/pro10957.html>
- Grunicke H (1995) Signal transduction mechanisms in cancer. 1. Aufl., Heidelberg: Springer
- Gu YC, Li GL, Yang YP, Fu JP, Li CZ (1989) Synthesis of some halogenated indirubin derivatives. *Acta Pharmaceutica Sinica* 24 (8), 629-32
- Gyuris J, Golemis E, Chertkov H, Brent R (1993) Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* 75 (4), 791-803
- Hall DA, Elving PJ (1970) Electrolytic reduction of indigo in pyridine application to the determination of dissolved oxygen. *Israel Journal of Chemistry* 8, 839-54
- Haller J (1938 a) Verfahren zur Herstellung von Dihalogenoxindolverbindungen. Patentschrift: DRP 694044
- Haller J (1938 b) Verfahren zur Herstellung von Sulfonamiden der Indolreihe. Patentschrift: DRP 715760
- Hampel W (1969) Synthese von Indigo. *Journal für praktische Chemie* 311, 78-81
- Han J (1988) Traditional Chinese Medicine and the Search for new Antineoplastic Drugs. *Journal of Ethnopharmacology* 24, 1-17
- Han R (1994) Highlight on the Studies of Anticancer Drugs Derived from Plants in China. *Stem Cells* 12, 53-63
- Hannon GJ, Casso D, Beach D (1994) KAP: a dual specificity phosphatase that interacts with cyclin-dependent kinases. *Proceedings of the National Academie of Sciences of the USA* 91 (5), 1731-5
- Hansch C (1969) A Quantitative Approach to Biochemical Structure-Activity Relationships. *Accounts of Chemical Research* 2, 232-9
- Hansch C, Klein TE (1991) Quantitative structure-activity relationships and molecular graphics in evaluation of enzyme-ligand interactions. *Methods Enzymol.* 202, 512-43
- Havlíček L, Hanuš J, Veselý J, LeClerc S, Meijer L, Shaw G, Strnad M (1997) Cytokinin-Derived Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors: Synthesis and cdc2 Inhibitory Activity of Olomoucine and Related Compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* 40, 408-12
- Heinze J (1984) Cyclovoltammetrie - die "Spektroskopie" des Elektrochemikers. *Angewandte Chemie* 96 (11), 823-916

- Hellman S, Vokes EE (1995) Fortschritte in der herkömmlichen Krebstherapie. Spektrum der Wissenschaft Spezial 5 Krebsmedizin, 59-65
- Hesse M, Meier H, Zeeh B (1987) Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. 3. Aufl., Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag
- Heumann K (1890 a) Neue Synthese des Indigos und verwandter Farbstoffe 1. Ueberführung des Phenylglycocolls in Indigblau. Chemische Berichte 23, 3043-5
- Heumann K (1890 b) Neue Synthese des Indigos und verwandter Farbstoffe 2. Darstellung von Indigblau mittelst Anthranilsäure. Chemische Berichte 23, 3431-5
- Heuvel, van den S, Harlow E (1993) Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. Science 262 (5142), 2050-4
- Hinchcliffe EH, Li C, Thompson EA, Maller JL, Sluder G (1999) Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. Science 283 (5403), 851-4
- Holloway SI, Glotzer M, King RW, Murray AW (1993) Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. Cell 73 (7), 1393-402
- Holt SJ, Sadler PW (1958) Studies in enzyme cytochemistry II. Synthesis of indigogenic substrates for esterases. Proceedings of the royal society of London (B) 148, 481-94
- Hössel R (1995) Synthese biologisch aktiver Bisindole. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern
- Hoessel R, Leclerc S, Endicott J, Noble M, Lawrie A, Tunnah P, Leost M, Damiens E, Marko D, Tang W, Eisenbrand G, Meijer L (1999) Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. Nature Cell Biology 1 (1), 60-67
- Hudkins RL, Diebold JL, Marsh FD (1995) Synthesis of 2-Aryl- and 2-Vinyl-1H-Indoles via Palladium-Catalysed Cross-Coupling of Aryl and Vinyl Halides with 1-Carboxy-2-(tributylstannyl)indole. Journal of Organic Chemistry 60, 6218-20
- Indirubin Cooperative Group (1980) Clinical study of indirubin in the treatment of 314 patients with chronic granulocytic leukemia. Chinese Journal of Haematology 1, 132
- Jackman M, Firth M, Pines J (1995) Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus. EMBO Journal 14 (8), 1646-54
- Ji XJ, Zhang FR, Lei JL, Xu YT (1981) Studies on the neoplastic effect and toxicity of synthetic indirubin. Acta Pharmaceutica Sinica 16, 146-8
- Ji XJ, Zhang FR (1985) Studies on Antineoplastic action of indirubin derivatives and analogues and their structure-activity relationship. Acta Pharmacologica Sinica 20, 137-9
- Ji XJ, Liu XM, Li K, Chen RH, Wang LG (1991) Pharmacological studies of meisoindigo: absorption and mechanism of action. Biomed. Environ. Sci. 4 (3), 332-7
- José-Yacamán M, Rendón L, Arenas L, Puche MCS (1996) Maya Blue Paint: An Ancient Nanostructured Material. Science 273, 223-5
- Kallakury BV, Sheehan CE, Ambros RA, Fischer HA, Kaufmann RPJr, Ross JS (1997) The prognostic significance of p34cdc2 and CyclinD1 protein expression in prostate adenocarcinoma. Cancer 80 (4), 753-63

- Kappus H (1986) Overview of enzyme systems involved in bioreduction of drugs and in redoxcycling. *Biochemical Pharmacology* 35, 1-6
- Karp JE, Broder S (1995) Molecular foundations of cancer: new targets for intervention. *Nature Medicine* 1 (4), 309-320
- Katritzky AR, Fan W-Q, Koziol AE, Palenik GJ (1989) 2-Chloro-3H-indol-3-one and its Reactions with Nucleophiles. *Journal of Heterocyclic Chemistry*
- Kaur G, Stetler-Stevenson M, Sebers S, Worland P, Sedlacek H, Myers C, Czech J, Naik R, Sausville E (1992) Growth inhibition with reversible cell cycle arrest of carcinoma cells by flavone L86-8275. *Journal of the National Cancer Institute*
- Kawakami K, Futami H, Takahara J, Yamaguchi K (1996) UCN-01, 7-hydroxyl-staurosporin, inhibits kinase activity of cyclin-dependent kinases and reduces the phosphorylation of the retinoblastoma susceptibility gene product in A549 human lung cancer cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 219 (3), 778-83
- Kim IC, Oriel PJ (1998) Method for production of indigo and indirubin dyes. Patentschrift: US 5834297
- Kimura K, Hirano M, Kobayashi R, Hirano T (1998) Phosphorylation and Activation of 13S Condensin by Cdc2 in Vitro. *Science* 282, 487-90
- King RW, Jackson PK, Kirschner MW (1994) Mitosis in transition. *Cell* 79 (4), 563-71
- Kitagawa M, Okabe T, Ogino H, Matsumoto H, Suzuki-Takahashi I, Kokubo T, Higashi H, Saitoh S, Taya Y, Yasuda H (1993) Butyrolactone I, a selective inhibitor of cdk2 and cdc2 kinase. *Oncogene* 8 (9), 2425-32
- Kitagawa M, Higashi H, Takahashi IS, Okabe T, Ogino H, Taya Y, Hishimura S, Okuyama A (1994) A cyclin-dependent kinase inhibitor, butyrolactone I, inhibits phosphorylation of RB protein and cell cycle progression. *Oncogene* 9 (9), 2549-57
- Klessinger M, Lüttke W (1963) Theoretische und spektroskopische Untersuchungen an Indigo-Farbstoffen - II Das chromophore System der Indigo-Farbstoffe. *Tetrahedron* 19 Suppl. 2, 315-35
- Knighton DR, Zheng J, Eyck LFT, Xuong N.-H., Taylor SS, Sowadski JM (1991) Structure of a Peptide Inhibitor Bound to the catalytic Subunit of Cyclic Adenosine Monophosphat-Dependent Protein Kinase. *Science* 253, 414-20
- Knowles LM, Milner JA (1998) Depressed p34cdc2 Kinase Activity and G2/M Phase Arrest by Diallyl Disulfide in HCT-15 Cells. *Nutrition and Cancer* 30 (3), 169-174
- Kondo S (1995) Apoptosis by antitumor agents and other factors in relation to cell cycle checkpoints. *Journal of Radiation Research* 36 (1), 56-62
- Kubo A, Uchino K (1981) Reactions of 2-chloroindoles: Synthesis of 2,2'-Bisindolyls. *Heterocycles* 16 (9), 1441-3
- Kuhara M, Chikashige M (1900) Formation of indigo from diphenyldiketopiperazine. *American Chemical Journal* 24, 167-70
- Laatsch H, Ludwig-Köhn H (1986) Isolierung des indigoiden Pigments Candidin aus Urin und Hämofiltrat von Urämikern. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1847-53

- Larsen AK (1993) Suramin: an anticancer drug with unique biological effects. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 32 (2), 96-8
- Lathourakis GE, Litinas KE (1996) Synthesis and study of 3-(triphenylphosphoranylidene)-2,3-dihydro-1H-indol-2-one. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I* 5, 491-3
- Lauck-Birkel S, Tang W, Wagner B, Fiebig HH, Kohlmüller D, Eisenbrand G (1994) Plasminogen Activator Activities in Human Tumor Xenografts and Their Exploitation for Selective Activation of Prodrugs by Plasmin. *Contributions to Oncology. Basel: Karger* 48 (14), 189-194
- Laurent MA (1841) Recherches sur l'indigo. *Annales de Chimie (Paris)* 3 (3), 462-506
- Lawrie AM, Noble MEM, Tunnah P, Brown NR, Johnson LN, Endicott JA (1997) Protein kinase inhibition by staurosporin revealed in details of the molecular interaction with CDK2. *Nature structural biology* 4 (9), 796-801
- Leclerc V, Leopold P (1996) The cyclin C/Cdk8 kinase. *Progress in Cell Cycle Research* 2, 197-204
- Ledesma MD, Correas L, Avila J, Diaz-Nido J (1992) Implication of brain cdc2 and MAP2 kinases in the phosphorylation of tau protein in Alzheimer's disease. *FEBS Letters* 308 (2), 218-24
- Lee K, Shih CY, Yang TY, Chen LS, Chao WM, Sun CS, Wang TC, Pien SK, Sung KH (1979) Ultrastructural study on the mechanism of the therapeutic effect of indirubin for human chronic granulocytic leukemia. *Natl. Med. J. China* 59 (3), 129-32
- Levenson AS, Jordan VC (1997) MCF-7: The first Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line. *Cancer Research* 57, 3071-8
- Lew J, Wang JH (1995) Neuronal cdc2-like kinase. *Trend in Biochemical Sciences* 20 (1), 33-7
- Lew DJ, Kornbluth S (1996) Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Current Opinon in Cell Biology* 8 (6), 795-804
- Li CL, Ji XJ (1983) A comparative study on the physiological disposition of 3H-indirubin and its ethyl and octadecyl derivatives in animals. *Acta Pharmaceutica Sinica* 18 (5), 332-8
- Li C, Go Y, Mao Z, Koyano K, Kai Y, Kanehisa N, Zhu Q, Zhou Z, Wu S (1996) The Synthesis, Antileukemic Activity, and Crystal Structures of Indirubin Derivatives. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 69, 1621-7
- Lide DR (Hrsg.) (Hrsg.) (1995) *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 76. Aufl., New York: CRC Press
- Liu W-K, Williams RT, Hall FL, Dickson DW, Yen S-H (1995) Detection of a Cdc2-Related Kinase associated with Alzheimer Paired Helical Filaments. *American Journal of Pathology* 146 (1), 228-238
- Liu XM, Wang LG, Li HY, Ji XJ (1996) Induction of Differentiation and Down-regulation of c-myc Gene Expression in ML-1 Human Myeloblastic Leukemia Cells by the Clinically Effective Anti-Leukemia Agent Meisoindigo. *Biochemical Pharmacology* 51, 1545-51
- Liu ZJ, Tanaka Y, Mine S, Morinobu A, Yagita H, Okumura K, Taniguchi T, Yamamura H, Minami Y (1998) Functional cooperation of cyclin C and c-Myc in mediating homotypic cell adhesion via very late antigen-4 activation and vascular cell adhesion molecule-1 induction. *Blood* 92 (12), 4700-11

- Losiewicz MD, Carlson BA, Kaur G, Sausville EA, Worland PJ (1994) Potent Inhibition of cdc2 Kinase Activity by the Flavonoid L86-8275. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 201, 589-95
- Lowe M, Rabouille C, Nakamura N, Watson R, Jackman M, Jämsä E, Rahman D, Pappin DJC, Warren G (1998) Cdc2 Kinase Directly Phosphorylates the cis-Golgi Matrix Protein GM130 and Is Required for Golgi Fragmentation in Mitosis. *Cell* 94, 783-93
- Lozoya X (1997) Pflanzliche Arzneimittel gestern und heute. *Spektrum der Wissenschaft Spezial 6 Pharmaforschung*, 10-16
- Madelung W (1912) Über eine neue Darstellungsweise für substituierte Indole. I. *Chemische Berichte* 45, 1128-34
- Madelung W (1914) Über neue Indigo-Synthesen. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 405, 58-95
- Malecz N, Foisner R, Stadler C, Wiche G (1996) Identification of Plectin as a Substrate of p34cdc2 Kinase and Mapping of a Single Phosphorylation Site. *Journal of Biological Chemistry* 271 (14), 8203-8
- Martinet MMJ (1919) Sur les indirubines. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'academie des sciences* 169, 183-5
- Martinet MMJ, Dornier O (1921) Sur l'acide isatine 5-sulfonique. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'academie des sciences* 172, 330-1
- Marx J (1994) New Tumor Suppressor May Rival p53. *Science* 264 (5157), 344-5
- Maser E (1995) Xenobiotic Carnonyl Reduction and Physiological Steroid Oxidireduction. *Biochemical Pharmacology* 49 (4), 421-40
- McCall JM (1975) Liquid-Liquid Partition Coefficients by High-Prssure Liquid Chromatography. *Journal of Medicinal Chemistry* 18 (6), 549-52
- Meijer L (1995) Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Progress in Cell Cycle Research* 1, 351-363
- Meijer L (1996) Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends in Cell Biology* 6, 393-7
- Meijer L, Borgne A, Mulner O, Chong JPJ, Blow JJ, Inagaki N, Inagaki M, Delcros JG, Moulinoux JP (1997) Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2 and CDK5. *European Journal of Biochemistry* 243, 527-36
- Meikrantz W, Gisselbrecht S, Tam SW, Schlegel R (1994) Activation of cyclin A-dependent protein kinases during apoptosis. *Proceedings of the National Academie of Sciences of the USA* 91 (9), 3754-8
- Meikrantz W, Schlegel R (1996) Suppression of apoptosis by dominant negative mutants of cyclin-dependent protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* 271 (17), 10205-9
- Merk HF, Jugert FK (1991) Cutaneous NAD(P)H: quinione reductase: a xenobiotica-metabolizing enzyme with potential cancer and oxidation stress-protecting properties. *Skin Pharmacology* 4 Suppl 1, 95-100
- Meyerson M, Enders GH, Wu CL, Su LK, Gorka C, Nelson C, Harlow E, Tsai LH (1992) A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO Journal* 11 (8), 2909-17

- Minami Y, Takao H, Kanafuji T, Miura K, Kondo M, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Matsubara H (1997) beta-Glucosidase in the indigo plant: intracellular localization and tissue specific expression in leaves. *Plant and Cell Physiology* 38 (9), 1069-74
- Misteli T, Warren G (1995) Mitotic disassembly of the Golgi apparatus in vivo. *Journal of Cell Science* 108 (Pt 7), 2715-27
- Montanari L, Pavanetto F, Mazza M (1981) . *Farmaco* 36 (10), 856-61
- Morales-Ríos M, Joseph-Nathan P (1991) 1H and 13C NMR Study of 1-Substituted Isatins and Their Corresponding 3-(Dicyanomethylidene)indol-2-ones. *Magnetic Resonance in Chemistry* 29, 893-896
- Morgan AR, Lee JS, Pulleyblank DE, Murray NL, Evans DH (1979) Ethidium fluorescence assays. Part I. Physicochemical studies. *Nucleic Acids Research* 7 (3), 547-69
- Morgan DO, Kaplan JM, Bishop JM, Varmus HE (1989) Mitosis-specific phosphorylation of p60c-src by p34cdc2-associated protein kinase. *Cell* 57 (5), 775-86
- Morgan DO (1995) Principles of CDK regulation. *Nature* 374 (6518), 131-4
- Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Titani K, Ihara Y (1995 a) Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *Journal of Biological Chemistry* 270 (2), 823-9
- Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Watanabe A, Titani K, Ihara Y (1995 b) Hyperphosphorylation of tau in PHF. *Neurobiology of Aging* 16 (3), 365-80
- Motokura T, Arnold A (1993) Cyclins and oncogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1155, 63-78
- Mueller PR, Coleman TR, Kumagai A, Dunphy WG (1995) Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* 270 (5233), 86-90
- Mußler B (1999) Etablierung von in vitro-Methoden zur Erfassung von endokrinen Disruptoren. Dissertation, Universität Kaiserslautern
- Mutschler E (1996) Arzneimittelwirkungen. 7. Aufl., Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
- Nicolaou KC, Guy RK, Potier P (1996) Taxoide: neue Waffen gegen Krebs. *Spektrum der Wissenschaft* 8, 76-80
- Niederberger E (1998) Mechanismusorientierte Untersuchungen zur antineoplastischen Wirkung von Naturstoffen und Naturstoffderivaten. Dissertation, Universität Kaiserslautern
- O'Brian CA, Ward NE (1990) Staurosporine: a prototype of a novel class of inhibitors of tumor cell invasion? *Journal of the National Cancer Institute* 82 (22), 1734-5
- O'Connor PM, Ferris DK, Hoffmann I, Jackman J, Draetta G, Kohn KW (1994) Role of the cdc25C phosphatase in G2 arrest induced by nitrogen mustard. *Proceedings of the National Academie of Sciences of the USA* 91, 9480-4
- O'Connor PM (1997) Mammalian G1 and G2 Phase Checkpoints. *Cancer Surveys Volume 29: Checkpoint Controls and Cancer*

- Ohashi M, Sugikawa E, Nakanishi N (1995) Inhibition of p53 protein phosphorylation by 9-hydroxyellipticine: a possible anticancer mechanism. *Japanese Journal of Cancer Research* 86 (9), 819-27
- Ohta T, Okamoto K, Isohashi F, Shibata K, Fukuda M, Yamaguchi S, Xiong Y (1998) T-loop Deletion of CDC2 from Breast Cancer Tissues Eliminates Binding to Cyclin B1 and Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p21. *Cancer Research* 58, 1095-98
- Ongkeko W, Ferguson DJ, Harris AL, Norbury C (1995) Inactivation of Cdc2 increases the level of apoptosis induced by DNA damage. *Journal of Cell Science* 108 (Pt 8), 2897-904
- Ookata K, Hisanaga S, Tachibana K, Kishimoto T (1992) Relocation and distinct subcellular localization of p34cdc2-cyclin B complex at meiosis reinitiation in starfish oocytes. *EMBO Journal* 11 (5), 1763-72
- Ookata K, Hisanaga S, Okumura E, Kishimoto T (1993) Association of p34cdc2/cyclin B complex with microtubules in starfish oocytes. *Journal of Cell Science* 105 (Pt 4), 873-81
- Pandraud H (1961) Structure Cristalline de l'Indirubine. *Acta Crystallographica* 14, 901-8
- Papageorgiou C, Borer X (1988) Acid-Catalyzed Rearrangements for a Diastereoselective Entry into a New Fused Hexacyclic Heterocycle: (5RS,7aRS,12RS,14aRS)-4,5,7,7a,11,12,14,14a-Octahydro-5,12-dimethyl-diindolo[1,7-bc:1',7'-gh][2,6]naphthyridine. *Helvetica Chimica Acta* 71, 1079-83
- Park DS, Farinelli SE, Greene LA (1996) Inhibitors of cyclin-dependent kinases promote survival of post-mitotic neuronally differentiated PC12 cells and sympathetic neurons. *Journal of Biological Chemistry* 271 (14), 8161-9
- Patra D, Dunphy WG (1998) Xe-p9, a Xenopus Suc1/Cks protein, is essential for the Cdc2-dependent phosphorylation of the anaphase-promoting complex at mitosis. *Genes & Development* 12, 2549-59
- Pereira ER, Sancelme M, Towa JJ, Prudhomme M, Martre AM, Mousset G, Rapp M (1996) Syntheses and antimicrobial activities of five-membered ring heterocycles coupled to indole moieties. *Journal of Antibiotics* 49 (4), 380-5
- Pereira ER, Prudhomme M, Sancelme M, Ollier M, Severe D, Riou JF, Crevel H, Savineau JP, Fabbro D, Meyer T (1997) Synthesis and biological evaluation of monoindolyl and indolocarbazolyl oxazolones and imidazolones. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 45 (4), 733-6
- Pines J (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochemical Journal* 308 (Pt 3), 697-711
- Pines J (1996) Cell cycle: reaching for a role for the Cks proteins. *Current Biology* 6 (11), 1399-402
- Plieninger H, Lerch U, Wild D (1965) Bildung von Indirubin und 2-Äthoxy-3-(indol-2-yl)-indol aus 2-Äthoxyindol. *Angewandte Chemie* 77 (11), 505
- Plieninger H, Wild D (1966) Reaktionen des 2-Äthoxy-indols und Oxindols. *Chemische Berichte* 99 (10), 3063-90
- Pons M, Gagne D, Nicolas JC, Methali M (1990) A new cellular model of response to estrogens: a bioluminescent test to characterize (anti) estrogen molecules. *Biotechniques* 9 (4), 450-9
- Poon RY, Hunter T (1995) Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin. *Science* 270 (5233), 90-3

- Powis G (1991) Signalling targets for anticancer drug development. *Trends in Pharmacological Sciences* 12, 188-94
- Promega (1996) Technical Bulletin No.161: Luciferase Assay System With Reporter Lysis Buffer. <http://www.promega.com>, Patentschrift: US 5283179, Promega, Madison: 2800 Woods Hollow Road, WI 53711-5399 USA
- Qi SB, He GX, Wang YD (1981) Pharmacological Studies on Indirubin. III. Pharmacokinetic Studies on indirubin in mice. *Chin. Trad. Herb. Drugs* 12, 23-7
- Ralston SL, Seidel A, Luch A, Platt KL, Baird WM (1995) Stereoselective activation of dibenzo[a,l]pyrene to (-)-anti(11R,12S,13S,14R)- and (+)-syn(11S,12R,13S,14R)-11,12-diol-13,14-epoxides which bind extensively to deoxyadenosine residues of DNA in the human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Carcinogenesis* 16 (12), 2899-2907
- Reed SI (1997) Control of the G1/S Transition. *Cancer Surveys Volume 29: Checkpoint Controls and Cancer*, 7-23
- Reifenberger G, Reifenberger J, Ichimura K, Meltzer PS, Collins VP (1994) Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2. *Cancer Research* 54 (16), 4299-303
- Riabowol K, Draetta G, Brizuela L, Vandre D, Beach D (1989) The cdc2 kinase is a nuclear protein that is essential for mitosis in mammalian cells. *Cell* 57 (3), 393-401
- Rialet V, Meijer L (1991) A New Screening Test for Antimitotic Compounds Using the Universal M Phase-Specific Protein Kinase, p34cdc2/cyclinBcdc13, Affinity-immobilized on p13suc1-Coated Microtitration Plates. *Anticancer Research* 11, 1581-90
- Rickert P, Corden JL, Lees E (1999) Cyclin C/CDK8 and cyclin H/CDK7/p36 are biochemically distinct CTD kinases. *Oncogene* 18 (4), 1093-102
- Rodgers EH, Grant MH (1998) The effect of the flavonoids, quercetin, myricetin and epicatechin on the growth and enzyme activities of MCF7 human breast cancer cells. *Chemico-biological Interactions* 116 (3), 213-28
- Rogers KS, Cammarata A (1969) Superdelocalizability and charge density. A correlation with partition coefficients. *Journal of Medicinal Chemistry* 12 (4), 692-3
- Rosenblatt J, De Bondt H, Jancarik J, Morgan DO, Kim S-H (1993) Purification and crystallisation of human cyclin-dependent protein kinase 2. *Journal of molecular biology* 230, 1317-9
- Rudolph B, Saffrich R, Zwicker J, Henglein B, Muller R, Ansorge W, Eilers M (1996) Activation of cyclin-dependent kinases by Myc mediates induction of cyclin A, but not apoptosis. *EMBO Journal* 15 (12), 3065-76
- Russell GA, Kaupp G (1969) Oxidation of Carbanions. IV. Oxidation of Indoxyl to Indigo in Basic Solution. *Journal of the American Chemical Society* 91, 3851-9
- Russo AA, Jeffrey PD, Pavletich NP (1996) Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Natural Structural Biology* 3 (8), 696-700
- Sandmeyer T (1903) Über die Synthese von Indigo aus Thiocarbanilid. *Zeitschrift für Farben- und Textil-Chemie* (7), 129-37

- Sartorelli AC (1982) Hypoxic cell specific chemotherapeutic agents. *Advances in Enzyme Regulation* 20, 233-44
- Sausville EA (1998) Phase I Study of Continuous-Infusion UCN-01 (a Staurosporine Analogue) for Refractory Solid Tumors or Lymphoma. <http://cancernet.nci.nih.gov/prot/docs/pro11135.html>
- Schätzle S (1999) p34cdc2-Kinase (CDK1) als Target von Indirubin-3'-oxim in humanen Tumorzellen. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern
- Schinzer D, Limberg A (1997) Epothilone: neue Wirkstoffe gegen Krebs. *Spektrum der Wissenschaft* 8, 38-43
- Schmidt H (1997) Indigo - 100 Jahre industrielle Synthese. *Chemie in unserer Zeit* 31 (3), 121-8
- Schneider R (1999) Steroidgekoppelte Prodrugs mit Thiazolidin-Grundkörper: Synthese und Untersuchungen zum Verhalten in wäßrigen Systemen. Dissertation, Universität Kaiserslautern
- Schönberg A, Junghans K (1963) Epoxyde durch Einwirkung von Diaryldiazomethanen auf Ketone. *Chemische Berichte* 96 (12), 3328-37
- Schraudolph H (1968) Untersuchungen zur Biogenese von Isatan-B, der Indigovorstufe auf der Färberwaid (*Isatis tinctoria* L.). *Zeitschrift für Naturforschung (B)* 23 (4), 572-3
- Schulze-Gahmen U, Brandsen J, Jones HD, Morgan DO, Meijer L (1995) Multiple Modes of Ligand Recognition: Crystal Structures of Cyclin-Dependent Protein Kinase 2 in Complex With ATP and Two Inhibitors, Olomoucine and Isopentenyladenine. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 22, 378-91
- Schulze-Gahmen U, De Bondt HL, Kim SH (1996) High-resolution crystal structures of human cyclin-dependent kinase 2 with and without ATP: bound waters and natural ligand as guides for inhibitor design. *Journal of Medicinal Chemistry* 39 (23), 4540-6
- Schunk E (1855) Indigo. In: Liebig J (Hrsg.), Knopp H (Hrsg.): *Jahresbericht über die Fortschritte der reinen, pharmaceutischen und technischen Chemie, Physik, Mineralogie und Geologie*, 659-665
- Sedlacek HH, Czech J, Naik R, Kaur G, Worland P, Losiewicz M, Parker B, Carlson B, Smith A, Senderowicz A, Sausville E (1996) Flavopiridol (L86 8275; NSC 649890), a new kinase inhibitor for tumor therapy. *International Journal of Oncology* 9, 1143-68
- Senderowicz AM, Headlee D, Stinson SF, Lush RM, Kalil N, Villalba L, Hill K, Steinberg SM, Figg WD, Tompkins A, Arbuck SG, Sausville EA (1998) Phase I trial of continuous infusion flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with refractory neoplasms. *Journal of Clinical Oncology* 16 (9), 2986-99
- Shenoy S, Choi JK, Bagrodia S, Copeland TD, Maller JL, Shalloway D (1989) Purified maturation promoting factor phosphorylates pp60c-src at the sites phosphorylated during fibroblast mitosis. *Cell* 57 (5), 763-74
- Shiekhhattar r, Mermelstein RP, Fisher RP, Drapkin R, Dynlacht B, Wessling HC, Morgan DO, Reinberg D (1995) Cdk-activating kinase complex is a component of human transcription factor TFIID. *Nature* 374 (6519), 283-7
- Shimizu T, O'Connor PM, Kohn KW, Pommier Y (1995) Unscheduled Activation of Cyclin B1/Cdc2 Kinase in Human Promyelocytic Leukemia Cell Line HL60 Cells Undergoing Apoptosis Induced by DNA Damage. *Cancer Research* 55, 228-31

- Sichuan Institute of Traditional Chinese Medicine (1981) Subacute toxicity of Indirubin in dogs. *Chin. Trad. Herb. Drugs* 12, 27-9
- Solomon MJ, Glotzer M, Lee TH, Philippe M, Kirschner MW (1990) Cyclin activation of p34cdc2. *Cell* 63 (5), 1013-24
- Solomon MJ, Harper JW, Shuttleworth J (1993) CAK, the p34cdc2 activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40MO15. *EMBO Journal* 12 (8), 3133-42
- Solomon MJ (1994) The function(s) of CAK, the p34cdc2-activating kinase. *Trends in Biochemical Sciences* 19 (11), 496-500
- Somei M, Kodama A (1992) A Novel Synthesis of 2,2'-Bisindole and its application for the synthesis of indolo[2,3-a]carbazole derivatives. *Heterocycles* 34 (7), 1285-8
- Somei M, Hayashi H, Izumi T, Ohmoto S (1995) Simple synthesis of 2,2'-bisindole from indigo and its application for the synthesis of indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7-(6H)dione and -5-(6H)one derivatives. *Heterocycles* 41 (10), 2161-4
- Somei M, Hayashi H, Ohmoto S (1997) Reduction of indigo: simple synthesis of 3-acetoxy-, 1-acetyl-2,3-dihydro-, 3-acetoxy-3'-acetyl-, 3-acetoxy-1,3-diacetyl-2,2'-bisindoles, and 2,2'-bisindole. *Heterocycles*, 169-76
- Someya A, Tanaka N, Okuyama A (1994) Inhibition of cell cycle oscillation of DNA replication by a selective inhibitor of the cdc2 kinase family, butyrolactone I, in *Xenopus* egg extracts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 198 (2), 536-45
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan L (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 51 (5), 1409-16
- Speiser B (1981) Elektroanalytische Methoden II: Cyclische Voltammetrie. *Chemie in unserer Zeit* 15 (2), 62-7
- Spencer G (1931) The hydrolysis of acetylindoxyllic acid and the acetylindoxyls. *Journal of the Society of Chemical Industry* 50, 63T-64T
- Springer H (1998) Zur Synthese N-substituierter Thiazolidine und ihrer Verwendung im Rahmen des Prodrug-Konzeptes. Dissertation, Universität Kaiserslautern
- Staudinger H, Goldstein J (1916) Aliphatische Diazoverbindungen. 6. Mitteilung: Diphenyl-diazomethan-Derivate. *Chemische Berichte* 49, 1923-8
- Stinson SF, Hill K, Siford TJ, Phillips LR, Daw TW (1998) Determination of flavopiridol (L86 8275; NSC 649890) in human plasma by reversed-phase liquid chromatography with electrochemical detection. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 42 (4), 261-5
- Tang W, Eisenbrand G (1992) *Chinese Drugs of Plant Origin*. Heidelberg: Springer
- Taya Y (1997) RB kinases and RB-binding proteins: new points of view. *Trends in Biochemical Sciences* 22 (1), 14-7
- Teuber H-J, Hohn J (1982) Reaktionen mit Nitrosodisulfonat, 40 Oxidation von Keto-Enolen. *Chemische Berichte* 115 (1), 90-8
- Th'ng JP, Wright PS, Hamaguchi J, Lee MG, Norbury CJ, Nurse P, Bradbury EM (1990) The FT210 cell line is a mouse G2 phase mutant with a temperature-sensitive CDC2 gene product. *Cell* 63 (2), 313-24

- Thommet A (1998) Synthese und biologische Wirkungen von in 6-Position substituierten Indirubin-Derivaten. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281 (5381), 1312-6
- Tian F-A, Li C-M, Li D-Y (1995) Structural and Antileukemic Studies of Indirubin Derivatives. *Chemical Research in Chinese Universities* 11 (1), 75-8
- Tsujimura K, Ogawara M, Takeuchi Y, Imajoh-Ohmi S, Ha MH, Inagaki M (1994) Visualization and function of vimentin phosphorylation by cdc2 kinase during mitosis. *Journal of Biological Chemistry* 269 (49), 31097-106
- Tu S, Pagliaro L, Kilbourn H, Banks M, Bugazia N, Finn L, Ellerhorst J, Amato R, Millikan H, Madden T, Newman R, Logothetis CJ (1997) Suramin (SUR) combined with Adriamycin (ADR) in the treatment of patients (pts) with advanced androgen-independent prostate carcinoma (AIPCA). Proceedings of the Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology 16 (A), 1239
- Unger SH, Cook JR, Hollenberg JS (1978) Simple Procedure for Determining Octanol-Aqueous Partition, Distribution, and Ionization Coefficients by Reversed-Phase High-Pressure Liquid Chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 67 (10), 1364-7
- Vainiotalo A, Vepsäläinen J (1986) ¹H and ¹³C NMR Studies on Nitrosonaphthols, and Their Complexation with the Dioxouranium(VI) Ion. *Magnetic resonance in Chemistry* 24, 758-761
- Vega S, Díaz JA (1997) Synthesis of New Hetero[2,1]benzothiazepine Derivatives. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 34, 1191-4
- Veselý J, Havlíček L, Strnad M, Blow JJ, Donella-Deana A, Pinna L, Letham DS, Kato J, Detivaud L, Leclerc S, Meijer L (1994) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *European Journal of Biochemistry* 224 (2), 771-86
- Voigt E, Meier H (1975) Über die Valenzisomerie von Diazoverbindungen und Diazirinen. *Chemische Berichte* 108, 3326-35
- Vorländer D, Pfeiffer J (1919) Über Diacetyl-indigo. *Chemische Berichte* 52, 325-9
- Wahl MMA, Bagard P (1909 a) Sur un nouvel isomère de l'indigo. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'académie des sciences*, 716-19
- Wahl MMA, Bagard P (1909 b) Sur un nouvel isomère de l'indigotine. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'academie des sciences* 4 (5), 1039-43
- Wahl MMA, Bagard P (1910) Sur la constitution de l'indirubine (I). *Bulletin de la Société Chimique de France (Paris)* (4 Ser) 7, 1090-1101
- Wahl MMA, Bagard P (1913 a) Synthèses dans le group des indigoides. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'academie des sciences* 156, 898-901
- Wahl MMA, Bagard P (1913 b) Synthèses dans le groupe de indigoides. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'academie des sciences* 156, 1382-5
- Wahl MM, Faivret T (1926) Recherches sur les méthyl-isoindigotines et les méthylindirubines. *Annales de Chimie (Paris)* 10 (5), 314-62
- Wan JH, You YC, Mi JX, Ying HG (1981) Effect of Indirubin on hematopoietic cell production. *Acta Pharmacologica Sinica* 2 (4), 241-4

- Wang XQ, Gan WJ, Yang TY, Wang ZC, Qiao LS, Qi RB (1984) Effect of indirubin on the cell surface of chronic myelocytic leukemia. *Tianjin Med. J* 12, 707-10
- Wang J, Walsh K (1996) Resistance to apoptosis conferred by Cdkinhibitors during myocyte differentiation. *Science* 273 (5273), 359-61
- Weinberg RA (1995) Wie Krebs entsteht. *Spektrum der Wissenschaft Spezial 5 Krebsmedizin*, 7-17
- Wen Z, Liu Y, Yi Z, Yang Y (1988) Effects of indirubin on the histology and histochemistry of canine and rat livers. *Chemical Abstracts* 109, 85853
- Weyler W, Dodge TC, Lauff JJ, Wendt DJ (1997) Use of an isatin hydrolase in the removal of isatin or indirubin in the fermentation of indigo / improved microbial production of indigo. Patentschrift: WO 9719175
- Witkop B, Fiedler H (1947) Gelenkte Oxydationen in der Indol-Reihe. II Eine neue Reaktionsweise der Perbenzoesäure. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 558, 91-8
- Worland PJ, Kaur G, Stetler-Stevenson M, Sebers S, Sartor O, Sausville EA (1993) Alteration of the phosphorylation state of p34cdc2 kinase by the flavone L86-8275 in breast carcinoma cells. Correlation with decreased H1 kinase activity. *Biochemical Pharmacology* 46 (10), 1831-40
- Woulfe P (1771) A Method of dyeing Wool and Silk, of a yellow colour, with Indigo; and also with several other blue and red colouring Substances. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 61, 127-30
- Wright J, Blatner GL, Cheson BD (1998) Clinical trials referral resource. *Clinical trials of flavopiridol. Oncology (Huntingt)* 12 (7), 1018-1024
- Wu GY, Liu JZ, Fang FD, Zuo J (1982) Studies on the Mechanism of indirubin action in the treatment of chronic granulocytic leukemia. V. Binding between indirubin and DNA and identification of the type of binding. *Sci. Sin. [B] [Engl.]* 25 (10), 1071-9
- Wu K-M, Zhang M-Y, Fang Z, Huang L (1984) Synthesis of N1-substituted derivatives of indirubin, an antileukemic compound. *Yaoxue Xuebao* 19 (7), 513-8
- Wu GY, Liu JZ, Zhang L (1985 a) Effect of bisindole compounds with three different kinds of linkage on the synthesis of nucleic acid and protein. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan* 61, 48-51
- Wu K-M, Zhang M-Y, Fang Z, Huang L (1985 b) Potential antileukemic agents, synthesis of derivatives of indirubin, indigo and isoindigotin. *Acta Pharmaceutica Sinica* 20 (11), 821-6
- Wyllie AH (1985) The biology of cell death in tumours. *Anticancer Research* 5 (1), 131-6
- Wyman GM, Zehäusern AF (1965) Spectroscopic Studies on Dyes. V. Derivatives of cis-Indigo. *Journal of Organic Chemistry* 30, 2348-52
- Xiong Y, Connolly T, Futcher B, Beach D (1991) Human D-type cyclin. *Cell* 65 (4), 691-9
- Xiong Y, Zhang H, Beach D (1992) D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 71 (3), 505-14
- Yasui W, Ayhan A, Kitadai Y, Nishimura K, Yokozaki H, Ito H, Tahara E (1993) Increased expression of p34cdc2 and its kinase activity in human gastric and colonic carcinomas. *International Journal of Cancer* 53 (1), 36-41

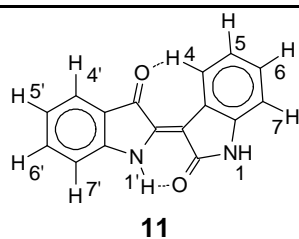
- Yih L-H, Ho I-C, Lee T-C (1997) Sodium Arsenite Disturbs Mitosis and Induces Chromosome Loss in Human Fibroblasts. *Cancer Research* 57, 5051-5059
- Yoshikawa M, Murakami T, Kishi A, Sakurama T, Matsuda H, Nomura M, Matsuda H, Kubo M (1998) Novel indole S,O-bisdesmoside, calanthoside, the precursor glycoside of tryptanthrin, indirubin, and isatin, with increasing skin blood flow promoting effects, from two *Calanthe* species (Orchidaceae). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 46 (5), 886-8
- Zariwala M, Liu J, Xiong Y (1998) Cyclin E2, a novel human G1 cyclin and activating partner of CDK2 and CDK3, is induced by viral oncoproteins. *Oncogene* 17 (21), 2787-98
- Zeng Q, Du D, Xie D, Wang X, Ran C (1982) Antitumor activities of indirubin derivatives. *Chemical Abstracts* 97, 138220
- Zhang L, Wu G, Qiu C, Gao B (1985) Effect of Indirubin on DNA-synthesis in vitro. *Acta Academiae Medicinae Sinicae* 7 (2), 112-6
- Zhang J, Sanchez RJ, Wang S, Guarnaccia C, Tossi A, Zahariev S, Pongor S (1994) Substrate specificity of CDC2 kinase from human HeLa cells as determined with synthetic peptides and molecular modeling. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 315 (2), 415-24
- Zhu Y-P, Woerdenbag HJ (1995) Traditional Chinese herbal medicine. *Pharmacy World & Science* 17 (4), 103-12

8 Anhang

8.1 Weitere NMR-Spektren

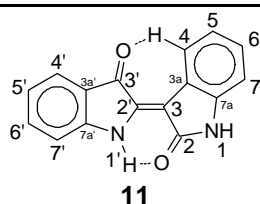
8.1.1 Indirubin (11)

Tab. 79: Signallage und Kopplungen im ^1H -NMR-Spektrum von 11 (Hössel, 1995)



| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|-----------|
| 10,86 und 10,65 | 2 s | N1H, N1'H |
| 8,76 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,4$ Hz | C4H |
| 7,65 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,4$ Hz | C4'H |
| 7,56 | m | C6'H |
| 7,39 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,0$ Hz | C7'H |
| 7,25 | m | C6H |
| 7,04 - 7,00 | m | C5H, C5'H |
| 6,92 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,2$ Hz | C7H |

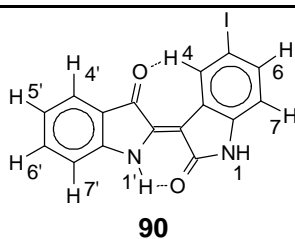
Tab. 80: Signallage und Kopplungen im ^{13}C -NMR-Spektrum von **11** (Hössel, 1995). Die Zuordnung von C7a und C7a' mußte aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Messungen revidiert werden.



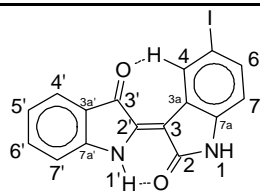
| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-------------------------|--|------------------|
| 188,27 | s | C3' |
| 171,11 | s | C2 |
| 152,35 | s | C2' |
| 141,07 | s | C7a |
| 138,48 | s | C7a' |
| 136,85 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 161,4$ Hz | C6' |
| 129,15 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 159,8$ Hz | C4 |
| 124,62 und 124,20 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 164,6$ Hz d, $^1J_{\text{C,H}} = 163,8$ Hz | C6 und C4' |
| 121,58 | s | C3a |
| 121,21 und 121,19 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 162,1$ Hz d, $^1J_{\text{C,H}} = 162,1$ Hz | C5 und C5' |
| 119,37 | s | C3a' |
| 113,15 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 168,7$ Hz | C7' |
| 109,57 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 162,2$ | C7 |
| 106,97 | s | C3 |

8.1.2 5-Iodindirubin (90)

Tab. 81: Signallage und Kopplungen im ^1H -NMR-Spektrum von **90** (Hössel, 1995)

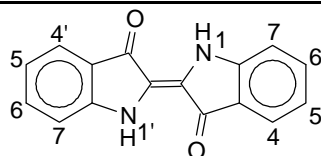


| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|-----------|
| 11,09 und 11,00 | 2 s | N1H, N1'H |
| 9,11 | s | C4H |
| 7,65 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,5$ Hz | C4'H |
| 7,59 - 7,52 | m | C6H, C6'H |
| 7,42 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,1$ Hz | C7'H |
| 7,07 - 7,01 | pt | C5'H |
| 6,75 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,1$ Hz | C7H |

Tab. 82: Signallage und Kopplungen im ^{13}C -NMR-Spektrum von **90** (Hössel, 1995)**90**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-------------------------|--|------------------|
| 188,54 | s | C3' |
| 170,48 | s | C2 |
| 152,41 | s | C2' |
| 141,44 | s | C7a |
| 139,26 | s | C7a' |
| 137,15 und 137,00 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 160,1$ Hz d, $^1J_{\text{C,H}} = 166,9$ Hz | C6' und C4 |
| 132,49 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 171,2$ Hz | C6 |
| 124,44 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 163,9$ Hz | C4' |
| 124,03 | s | C3a |
| 121,65 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 163,6$ Hz | C5' |
| 119,27 | s | C3a' |
| 113,43 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 167,2$ Hz | C7' |
| 111,85 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 164,6$ Hz | C7 |
| 105,18 | s | C3 |
| 83,73 | d, $^3J_{\text{C,H}} = 16,9$ Hz | C5 |

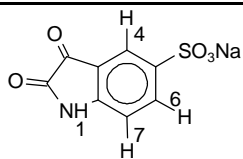
8.1.3 Indigo (12)

Tab. 83: Signallage und Kopplungen im ^1H -NMR-Spektrum von Indigo (12)**12**

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|-----------|
| 10,50 | s | N1H, N1'H |
| 7,61 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,6$ Hz | C4H, C4'H |
| 7,52 | pt | C6H, C6'H |
| 7,34 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 7,9$ Hz | C7H, C7'H |
| 6,95 | pt | C5H, C5'H |

8.1.4 Natriumsalz der Isatin-5-sulfonsäure (27b)

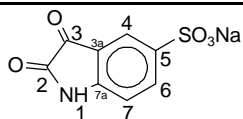
Tab. 84: Signallage und Kopplungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 27b



27b

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|--------------------------------|-----------|
| 11,12 | s | N1H |
| 7,83 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,1$ Hz | C6 |
| 7,63 | s | C4 |
| 6,89 | d, $^3J_{\text{H,H}} = 8,1$ Hz | C7 |

Tab. 85: Signallage und Kopplungen im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von 27b



27b

| δ in ppm | Signalform, Kopplung | Zuordnung |
|-----------------|----------------------------------|-----------|
| 184,10 | s | C3 |
| 159,58 | s | C2 |
| 150,53 | s | C7a |
| 143,03 | s | C5 |
| 135,35 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 163,7$ Hz | C6 |
| 121,37 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 166,5$ Hz | C4 |
| 116,88 | s | C3a |
| 111,38 | d, $^1J_{\text{C,H}} = 166,4$ Hz | C7 |

8.2 Substanznummern

| | | | |
|-----|--|-----|--|
| 1 | Indican | 40 | Anilin |
| 2 | Isatan B | 41 | Phenylglycinnitril |
| 3 | Calanthosid | 42 | L-Tryptophan |
| 4 | Indoxylsulfat | 43 | Indol |
| 5 | Tyrindoxylsulfat | 44 | (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2,3-Dihydroindol-2,3-diol |
| 6 | Kalium 2-(methylthio)-indol-3-ylsulfat | 45 | <i>N,N'</i> -Di- <i>o</i> -tolylloxalamid |
| 7 | Kalium 6-bromindol-3-ylsulfat | 46 | 2,2'-Bisindol |
| 8 | Kalium 6-brom-2-(methylsulfonyl)-indol-3-ylsulfat | 47 | <i>N,N'</i> -Bis(2-benzoylphenyl)-oxamid |
| 9 | Indoxyl | 48 | 3,3'-Diphenyl-2,2'-bisindol |
| 9a | Indoxylnatriumsalz | 49 | Butyrolacton-I |
| 10 | Isatin | 50 | 9-Hydroxyellipticin |
| 11 | Indirubin | 51 | Isopentenyladenin |
| 11a | (<i>E</i>)-Indirubin (<i>cis</i> -Indirubin) | 52 | Olomoucine |
| 12 | Indigo | 53 | Roscovitin |
| 13 | Isoindigo | 54a | Purvalanol A |
| 14 | 2-Chlor-3 <i>H</i> -indol-3-on | 54b | Purvalanol B |
| 15 | Oxindol | 55 | Suramin |
| 16 | 2-Methoxy-3 <i>H</i> -Indol-3-on | 56a | Staurosporin |
| 17 | 1-Hydroxy-3-benzoyloxy-2,3-dihydroindol-2-thion | 56b | UCN-01 |
| 18 | 2-Phenyliminoisatin | 57 | Diallyldisulfid |
| 19 | Indoxylacetat | 58 | Methylselenocystein |
| 20 | 2-Phenylazoindoxyl | 59a | Flavopiridol (L86 8275) |
| 21 | (2-Nitrophenyl)-(2-oxo-2,3-dihydroindol-3-yl)-ethandion | 59b | L86 8276 |
| 22 | Isatin-3-oxim | 60 | 1-Methylisatin |
| 23 | 2-Ethoxyindol | 61 | 5-Fluorisatin |
| 24 | 1-Methoxyindol | 62 | 5-Fluorindirubin |
| 25 | 1-Methylindirubin | 63 | 5-Methylisatin |
| 26 | 1-Phenylisatin | 64 | 5-Nitroisatin |
| 27 | Isatin-5-sulfonsäure | 65 | 5-Nitroindirubin |
| 27a | Kaliumsalz der Isatin-5-sulfonsäure | 66 | 5-Bromindoxylacetat |
| 27b | Natriumsalz der Isatin-5-sulfonsäure | 67 | 5'-Bromindirubin |
| 28 | 1-Phenylindirubin | 68 | 5,5'-Dibromindirubin |
| 29 | Indirubin-5-sulfonsäure | 69 | 5'-Bromindirubin-5-sulfonsäure |
| 29a | Kaliumsalz der Indirubin-5-sulfonsäure | 69a | Natriumsalz der 5'-Bromindirubin-5-sulfonsäure / 5'-Bromindirubin-5-sulfonat |
| 29b | Natriumsalz der Indirubin-5-sulfonsäure / Indirubin-5-sulfonat | 70 | 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonylchlorid |
| 30 | 5-Bromisatin | 71 | Isatin-5-sulfonamid |
| 31 | 5-Bromindirubin | 71a | <i>N,N',N'</i> -Trideuteroisatin-5-sulfonamid |
| 32 | 5-Chlorisatin | 72 | Indirubin-5-sulfonamid |
| 33 | 5-Chlorindirubin | 72a | <i>N,N',N'',N''</i> -Tetradeuteroindirubin-5-sulfonamid |
| 34 | <i>N</i> -Phenylglycin | 73 | 3,3-Dichlor-2-oxindol-5-sulfonsäuremethylamid |
| 34a | Kaliumsalz des <i>N</i> -Phenylglycins | 74 | Isatin-5-sulfonsäuremethylamid |
| 34b | Natriumsalz des <i>N</i> -Phenylglycins | 75 | Indirubin-5-sulfonsäuremethylamid |
| 35 | 5-Methyl-2-phenylimino-2,3-dihydro-3-on | 75a | <i>N,N',N''</i> -Trideuteroindirubin-5-sulfonsäuremethylamid |
| 36 | 5-Methylindirubin | 76 | 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonsäure(dimethyl)-amid |
| 37 | 2-Phenylelessigsäure | 77 | Isatin-5-sulfonsäure(dimethyl)amid |
| 38 | 2-(2-Nitrophenyl)-essigsäure | 78 | Indirubin-5-sulfonsäuredimethylamid |
| 39 | 3-Aminooxindol | | |

- 79** 2-Aminoethanol (Ethanolamin)
80 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid
81 Isatin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid)
82 Indirubin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid
82a *N,N',N'',O''*-Tetradeuterindirubin-5-sulfonsäure(2-hydroxyethyl)-amid
83 2,2'-Iminodiethanol (Diethanolamin)
84 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid
85 Isatin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid
86 Indirubin-5-sulfonsäurebis(2-hydroxyethyl)-amid
87 Indirubin-3'-oxim
87a Deprotoniertes Indirubin-3'-oxim
88a (*Z*) 4,9-Dihydro-2,9-dimethyl-10,10-dioxo-4-hydroximino-2H-pyrazol[3,4-c]-[2,1]benzothiazepin
88b (*E*) 4,9-Dihydro-2,9-dimethyl-10,10-dioxo-4-hydroximino-2H-pyrazol[3,4-c]-[2,1]benzothiazepin
89 1-Nitroso-2-naphthol
89a Deprotoniertes 1-Nitroso-2-naphthol
90 5-Iodindirubin
91 5-Iodindirubin-3'-oxim
92 3'-Hydroxyiminoindirubin-5-sulfonsäure
92a Natriumsalz der 3'-Hydroxyiminoindirubin-5-sulfonsäure / 3'-Hydroxyiminoindirubin-5-sulfonat
93 *o*-Toluidin
94 Oxalylchlorid
95 2-Aminobenzophenon
96 3,3'-Dimethyl-2,2'-bisindol
97 Hydroperoxid von 96
98 Hydroperoxid von 48
99 Radikalanion des Indirubins
100 Dianion des Leukoindirubins
100a Cis-Form des Dianions des Leukoindirubins
101 Radikalkation des Indirubins
102 Deprotoniertes Radikalkation des Indirubins
103 Einfach deprotoniertes Dikation des Indirubins
104 Indirubin-3'-oxim-methylether
105 Indirubin-3'-oxim-ethylether
106 1-Methylindirubin-3'-oxim-methylether

Veröffentlichung aus dieser Arbeit

Hoessel R, Leclerc S, Endicott J, Noble M, Lawrie A, Tunnah P, Leost M, Damiens E, Marko D, Tang W, Eisenbrand G, Meijer L: Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases.

Nature Cell Biology 1999, 1 (1), 60-67

Dank

Ich danke allen, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Der Arbeitsgruppe von Dr. Laurent Meijer in Roscoff, Frankreich danke ich für die gute Zusammenarbeit, für zwei lehrreiche und schöne Tage in der Bretagne und vor allem die umfangreiche Testung der Substanzen an den CDKs. Dr. Jane Endicott an der Universität von Oxford, Großbritannien danke ich für die röntgenstrukturanalytischen Untersuchungen der cokrystallisierten Enzym/Hemmstoffkomplexe und die Darstellung der Ergebnisse in der hier abgebildeten Form. Der Arbeitsgruppe von Prof. Heiner Fiebig und besonders Dr. Thomas Roth danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Durchführung zahlreicher Colony-Forming-Assays und der *in vivo*-Versuche. Achim Elvers vom Institut für Anorganische Chemie in Erlangen danke ich für die Durchführung der Cyclovoltammetrie.

Elke Litmianski, Ellen Niederberger, Wolfgang Petry und Simone Schätzle danke ich für die Durchführung vieler Zelltests. Wolfgang Petry danke ich für die Unterstützung bei der GC/MS, bei manchen Synthesen und der Ermittlung der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten. Frau Ruzek, Kerstin Schulte und Anja Müller danke ich für die Aufnahme zahlreicher NMR-Spektren. Marion Schmitz und Sven Asmus danke ich für die Aufnahme der Massenspektren. Sonja Böhm, Daniela Seng und Sabine Guth danke ich für die Durchführung des Luciferase-Assays. Ingrid Romani danke ich für die Erledigung der Post und mancher Verwaltungsangelegenheit.

Prof. Weici Tang danke ich für seine stets vorhandene Diskussionsbereitschaft, die Übersetzung diverser chinesischsprachiger Quellen und die kritische Durchsicht wichtiger Teile des Manuskripts.

Meinen Forschungspraktikantinnen Esther von Nida und Claudine Cillien danke ich für ihre fleißige und ergebnisreiche Mitarbeit.

Bernd Mußler danke ich für spannende Stunden an den SGI-Workstations. Karl-Heinz Merz danke ich für seine freundliche Einführung in die Weihen des Computerbeauftragten.

Dr. Doris Marko danke ich für ihre Diskussionsbereitschaft in Sachen Zellzyklus und Colony-Forming-Assay sowie ihre kritische Durchsicht des biologischen Teils des Manuskripts. Andrea Thommet danke ich für die kritische Durchsicht des chemischen Teils des Manuskripts.

Besonders danke ich meinem Laborkollegen Wolfgang für die gute Zusammenarbeit und das freundschaftliche Laborklima.

Axel danke ich für das Korrekturlesen, seine unermüdliche Hilfe bei der Computerei und für alles andere.

Lebenslauf

Ralph Hössel

Angaben zur Person

Geburtstag: 28.03.66

Geburtsort: Schweinfurt

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

- Promotion** 1995 - 1999 Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Eisenbrand, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, Universität, *Kaiserslautern*
wissenschaftliche Aussprache: 08.06.99
- Studium** 1991 - 1995 Studium der Chemie: Universität, *Kaiserslautern*
Diplomzeugnis: 31.05.95
- 1988 - 1991 Studium der Chemie: Julius-Maximilians-Universität, *Würzburg*
Zeugnis der Diplomvorprüfung: 22.03.91
- 1987 - 1988 Studium der Physik: Julius-Maximilians-Universität, *Würzburg*
- Zivildienst** 1985 - 1987 Alten- und Pflegeheim Wilhelm-Löhe-Haus, *Schweinfurt*
- Schulbildung** 1976 - 1985 Gymnasium: Alexander-von-Humboldt-Gymnasium, *Schweinfurt*
Abiturzeugnis: 28.06.85
- 1972 - 1976 Grundschule: Friedensschule, *Schweinfurt*