

**Struktur und Wirkung
von Metaboliten indigoider Bisindole,
neuartiger Hemmstoffe von Cyclin-abhängigen
Kinasen**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"
eingereichte Dissertation
(D 386)

vorgelegt von
Dipl.-Chem. Frankie Hippe

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

Kaiserslautern 2006

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 19.01.2006

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. S. Ernst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Eisenbrand

2. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Kubik

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Juni 2000 und Juni 2004 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der Universität Kaiserslautern.

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

Herrn Prof. Dr. S. Kubik danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Bei Herrn Prof. Dr.-Ing. S. Ernst möchte ich mich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bedanken.

Für Anne

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	4
2.1	Indirubine	4
2.1.1	Untersuchungen zur Wirksamkeit und Toxizität in früheren Studien	4
2.1.2	Röntgenstrukturanalyse von Indirubin-Derivaten	5
2.1.3	Indirubine als CDK-Inhibitoren und Tumorwachstums-hemmstoffe	7
2.1.4	Wasserlöslichkeit und Bioverfügbarkeit der Indirubine	9
2.1.5	Neue Indirubine mit hydrophilen Substituenten-CDK-Inhibition und Wachstumshemmung	10
2.1.6	<i>In vivo</i> Tests	12
2.2	CDKs - Regulatoren des Zellzyklus	13
2.2.1	Der Zellzyklus	13
2.2.2	CDKs – Funktion, Aufbau und Struktur	14
2.2.2.1	Aktivierung	15
2.2.2.2	Inaktivierung	16
2.2.3	CDKs und Cycline im Zellzyklus	17
2.2.4	Funktionen von CDK5 und CDK7	19
2.2.5	Fehler im CDK-System und ihre pathogenetische Relevanz	19
2.2.6	Weitere niedermolekulare Hemmstoffe von CDKs	21
2.3	Weitere Targets von Indirubinen	23
2.3.1	GSK-3 β	23
2.3.2	STAT3-Hemmung - Nicht-Tyrosin-Rezeptorkinasen	28
2.3.3	VEGFR-Hemmung - Tyrosin-Rezeptorkinasen	31
2.4	Fremdstoffmetabolismus	33
2.4.1	Cytochrom-P450-Isoenzyme	33
2.4.2	Nomenklatur	34
2.4.3	Mechanismus der Oxidation durch Cytochrom P450	35
2.5	Synthese	37
2.5.1	Allgemeine Indirubin-Synthesen	37
2.5.1.1	Herstellung von Isatinen	37
2.5.1.2	Herstellung von Indoxyl-3-acetat-Derivaten	41
2.5.2	Herstellung von Indirubin-3'-oxim-Derivaten und Indirubin-3'-oximethern	43

3	Problemstellung	45
4	Eigene Ergebnisse und Diskussion	47
4.1	Analytik	47
4.1.1	Untersuchungen zum oxidativen in-vitro-Metabolismus von 5-Methylindirubin (6)	47
4.1.1.1	Methodik	47
4.1.1.1.1	Vorgehen	47
4.1.1.1.2	LC-MS-Methodenentwicklung zur Trennung und Charakterisierung der Metaboliten	48
4.1.1.1.2.1	HPLC-Trennung	48
4.1.1.1.2.2	Optimierung der MS-Bedingungen	49
4.1.1.2	Metaboliten von 5-Methylindirubin (6)	50
4.1.1.2.1	Inkubation mit Rinderlebermikrosomen	50
4.1.1.2.2	Inkubation mit Schweinelebermikrosomen	56
4.1.1.2.3	Inkubation mit Rattenlebermikrosomen	57
4.1.1.2.3.1	Inkubation mit nicht induzierten Rattenlebermikrosomen	57
4.1.1.2.3.2	Inkubation mit Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen	58
4.1.1.2.4	Identifizierungen der Metaboliten	61
4.1.1.2.4.1	MS/MS-Daten	61
4.1.1.2.4.1.1	MS/MS-Daten von 5-Methylindirubin	61
4.1.1.2.4.1.2	MS/MS-Daten von Metabolit M2	62
4.1.1.2.4.1.3	MS/MS-Daten von Metabolit M3	63
4.1.1.2.4.1	¹ H-NMR von M2 und M3	64
4.1.2	Untersuchungen zum oxidativen in-vitro-Metabolismus von ausgewählten Indirubin-Derivaten	65
4.1.2.1	Metabolismus von 5-Methoxy-indirubin (40)	65
4.1.2.2	Metabolismus von 5-Bromindirubin (39)	67
4.1.2.3	Metabolismus von Indirubin-3'-(2-hydroxyethyl)oximether (10)	69
4.1.2.4	Metabolismus von glycosidischen Indirubin-Derivaten	72
4.1.2.4.1	Metabolismus von Indirubin-3'-(2-β-D-glucopyranosylethyl)oximether (15)	72
4.1.2.4.2	Metabolismus von 5-Iodindirubin-3'-(2-β-D-glucopyranosylethyl)oximether (41)	75
4.1.2.4.3	Metabolismus von 5-Methylindirubin-3'-(2-β-D-glucopyranosylethyl)oximether (16)	77

4.1.2.5	Abschätzung der relativen Umsatzgeschwindigkeit ausgewählter Indirubin-Derivate _____	80
4.1.3	Zusammenfassung der Ergebnisse zum oxidativen in-vitro- Metabolismus von ausgewählten Indirubin-Derivaten _____	81
4.2	Synthese:	
	Herstellung der Metaboliten M2 (74) und M3 (75) von 5-Methylindirubin (6) _____	84
4.2.1	Metabolit M2: 6-Hydroxy-5-methyl-indirubin (74) _____	86
4.2.1.1	Synthesekonzept / Syntheseweg: 6-Hydroxy-5-methyl-isatin (76) _____	86
4.2.1.2	Synthese der benötigten Ausgangsverbindungen zur Herstellung von 6-Hydroxy-5-methyl-isatin (76) _____	88
4.2.1.2.1	Herstellung von 4-Methyl-3-(triisopropylsilyloxy)-anilin (79) _____	88
4.2.1.2.1.1	Synthese und Mechanismus _____	88
4.2.1.2.1.2	¹³ C-NMR-Daten des 4-Methyl-3-(triisopropylsilyloxy)-anilins (79) _____	89
4.2.1.2.2	Herstellung von tert-Butyl-(4-methyl-3-(triisopropyl- silyloxy)-phenyl)-carbammat (81) _____	90
4.2.1.2.2.1	Synthese und Mechanismus _____	90
4.2.1.2.2.2	¹³ C-NMR-Daten des tert-Butyl-(4-methyl-3- (triisopropyl-silyloxy)-phenyl)-carbammat (81) _____	91
4.2.1.3	Herstellung von 6-Hydroxy-5-methyl-isatin (76) _____	92
4.2.1.3.1	Synthese und Mechanismus _____	92
4.2.1.3.2	¹ H-NMR-Daten des 6-Hydroxy-5-methyl-isatins (76) _____	94
4.2.1.3.3	¹³ C-NMR-Daten des 6-Hydroxy-5-methyl-isatins (76) _____	95
4.2.1.4	Herstellung von 6-Hydroxy-5-methyl-indirubin (74): M2 _____	96
4.2.1.4.1	Synthesekonzept und Mechanismus _____	96
4.2.1.4.2	¹ H-NMR-Daten des 6-Hydroxy-5-methyl-indirubins (74) _____	97
4.2.1.4.3	¹³ C-NMR-Daten des 6-Hydroxy-5-methyl-indirubins (74) _____	99
4.2.2	Metabolit M3: 6,7'-Dihydroxy-5-methylindirubin (75) _____	102
4.2.2.1	Synthesekonzept / Syntheseweg: 6,7'-Dihydroxy-5-methylindirubin (75) _____	102
4.2.2.2.	Synthese der benötigten Ausgangsverbindungen zur Herstellung von 7-Hydroxy-indoxyl-3-acetat (77) _____	103
4.2.2.3	Synthese der Ausgangsverbindungen zur Herstellung von N- Acetyl-7-benzyloxy-indolin-3-on (106) _____	106
4.2.2.3.1	Herstellung von 3-Acetamino-2-nitro-benzoesäure (96) _____	106
4.2.2.3.1.1	Synthese und Mechanismus _____	106
4.2.2.3.1.2	¹ H-NMR-Daten der 3-Acetamino-2-nitro-benzoesäure (96) _____	107
4.2.2.3.2	Herstellung von 3-Hydroxy-2-nitro-benzoesäure (97) _____	108
4.2.2.3.2.1	Synthese und Mechanismus _____	108

4.2.2.3.2.2	¹ H-NMR-Daten der 3-Hydroxy-2-nitro-benzoesäure (97)	109
4.2.2.3.3	Herstellung von 3-Benzyl oxy-2-nitro-benzoesäure- benzylester (98)	110
4.2.2.3.3.1	Synthese und Mechanismus	110
4.2.2.3.3.2	¹ H-NMR-Daten des 3-Benzyl oxy-2-nitro-benzoesäurebenzylesters (98)	111
4.2.2.3.4	Herstellung von 3-Benzyl oxy-2-nitro-benzoesäure (99)	112
4.2.2.3.4.1	Synthese und Mechanismus	112
4.2.2.3.4.2	¹ H-NMR-Daten des 3-Benzyl oxy-2-nitro-benzoesäure (99)	113
4.2.2.3.5	Herstellung von 2-Amino-3-benzyl oxy-benzoesäure (100)	114
4.2.2.3.5.1	Synthese und Mechanismus	114
4.2.2.3.5.2	¹ H-NMR-Daten der 2-Amino-3-benzyl oxy- benzoesäure (100)	115
4.2.2.3.6	Herstellung von 3-Benzyl oxy-anthranilsäure-formalid (101)	116
4.2.2.3.6.1	Synthese und Mechanismus	116
4.2.2.3.6.2	¹³ C-NMR-Daten des 3-Benzyl oxy-anthranilsäure- formalids (101)	117
4.2.2.3.7	Herstellung von <i>N</i> -(2-Benzyl oxy-6-carboxyphenyl)- glycin-nitril (102)	119
4.2.2.3.7.1	Synthese und Mechanismus	119
4.2.2.3.7.2	¹ H-NMR-Daten des <i>N</i> -(2-Benzyl oxy-6- carboxyphenyl)-glycin-nitrils (102)	119
4.2.2.3.8	Herstellung von <i>N</i> -(2-Benzyl oxy-6-carboxyphenyl)- glycin (103)	120
4.2.2.3.8.1	Synthese und Mechanismus	120
4.2.2.3.8.2	¹ H-NMR-Daten des <i>N</i> -(2-Benzyl oxy-6- carboxyphenyl)-glycins (103)	121
4.2.2.3.9	Herstellung von 1,3-Diacetyl-7-benzyl oxy-indoxyl (104)	122
4.2.2.3.9.1	Synthese und Mechanismus	122
4.2.2.3.9.2	¹ H-NMR-Daten des 1,3-Diacetyl-7-benzyl oxy- indoxyls (104)	124
4.2.2.4	Herstellung von <i>N</i> -Acetyl-7-benzyl oxy-indolin-3-on (106)	125
4.2.2.4.1	Synthese und Mechanismus	125
4.2.2.4.2	¹ H-NMR-Daten des <i>N</i> -Acetyl-7-benzyl oxy-indolin-3-on (106)	125
4.2.2.4.3	¹³ C-NMR-Daten des <i>N</i> -Acetyl-7-benzyl oxy-indoxyls (106)	127

4.2.2.5	Herstellung von 6,7'-Dihydroxy-5-methyl-indirubin (75)	128
4.2.2.5.1	Synthesekonzept und Mechanismus	128
4.2.2.5.2	¹ H-NMR-Daten des 6,7'-Dihydroxy-5-methyl-indirubins (75)	129
4.2.2.5.3	¹³ C-NMR-Daten des 6,7'-Dihydroxy-5-methyl-indirubins (75)	131
4.3	Vergleich der synthetisierten Metaboliten mit den aus Lebermikrosomen-Inkubationen isolierten Metaboliten	134
4.4	Biologische Untersuchungen	137
4.4.1	Sulforhodamin B (SRB)-Assay	137
5	Zusammenfassung	140
6	Experimenteller Teil	142
6.1	Allgemeine Arbeitstechnik und Chemikalien	142
6.2	Geräte und Methoden	142
6.3	Mikrosomen-Präparation	144
6.3.1	Verwendete Chemikalien	144
6.3.2	Lösungen	144
6.3.3	Gewinnung der tierischen Lebermikrosomen	145
6.3.4	Aroclorinduzierte Rattenlebermikrosomen	146
6.3.5	Bestimmung des Proteingehaltes	146
6.3.6	Quantitative Bestimmung der CYP450- und Cytochrom b ₅ -Gehalte	147
6.4	Metabolismus von Indirubine	148
6.4.1	Inkubation der Mikrosomen	148
6.4.2	Analyse der Produkte	149
6.5	Massenspektrometer	150
6.5.1	Bedingungen	150
6.5.2	Optimierung	153
6.6	Synthesevorschriften und analytische Daten	154
6.6.1	Synthese der Ausgangsverbindungen zur Herstellung von 6- Hydroxy-5-methyl-indirubin (75)	154
6.6.1.1	Herstellung von 4-Methyl-3-(triisopropylsilyloxy)-anilin (79)	154
6.6.1.2	Herstellung von tert-Butyl-(4-methyl-3-(triisopropylsilyloxy)- phenyl)-carbammat (81)	155
6.6.1.3	Herstellung von 6-Hydroxy-5-methyl-isatin (76)	157
6.6.2	Herstellung von 6-Hydroxy-5-methyl-indirubin (74)	158
6.6.3	Synthese der Ausgangsverbindungen zur Herstellung von 6,7'- Dihydroxy-5-methylindirubin (75)	160
6.6.3.1	Herstellung von 3-Acetamino-2-nitro-benzoesäure (96)	160
6.6.3.2	Herstellung von 3-Hydroxy-2-nitro-benzoesäure (97)	161

6.6.3.3	Herstellung von 3-Benzylloxy-2-nitro-benzoesäurebenzylester (98)	162
6.6.3.4	Herstellung von 3-Benzylloxy-2-nitro-benzoesäure (99)	163
6.6.3.5	Herstellung von 2-Amino 3-benzylloxy-benzoesäure (100)	164
6.6.3.6	Herstellung von 3-Benzylloxy-anthranilsäure-formalid (101)	165
6.6.3.7	Herstellung des N-(2-Benzylloxy-6-carboxyphenyl)-glycin- nitrils (102)	167
6.6.3.8	Herstellung von N-(2-Benzylloxy-6-carboxyphenyl)-glycin (103)	168
6.6.3.9	Herstellung von 1,3-Diacetyl-7-benzylloxy-indoxyl (104)	169
6.6.3.10	Herstellung von N-Acetyl-7-benzylloxy-indolin-3-on (106)	170
6.6.4	Herstellung von 6,7'-Dihydroxy-5-methyl-indirubin (75)	172
7	Literaturverzeichnis	174
8	Anhang	186

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
amu	engl. <i>atomic mass unit</i>
API 2000	Tripelquadrupol-Massenspektrometer der Firma PE Sciex
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bzw.	beziehungsweise
BOC	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl...
CAD	Kollisionsaktivierte Dissoziation
CAK	<u>CDK</u> <u>a</u> ktivierende <u>K</u> inase
cdc	engl. <i>cell division cycle</i> : Zellteilungszyklus
cdc2	Enzym 2 des Zellteilungszyklus (<i>cell division cycle 2</i> , identisch mit CDK1)
CDK	engl. <i>cyclin-dependent kinase</i> : cyclin-abhängige Kinase
CE	<u>C</u> ollision <u>E</u> nergy, variable Spannung am API 2000
CEP	<u>C</u> ollision <u>C</u> ell <u>E</u> ntrance <u>P</u> otential, variable Spannung am API 2000
CKI	engl. <i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i> : Inhibitor cyclin-abhängiger Kinasen
CML	<u>C</u> hronisch <u>m</u> yeloische <u>L</u> eukämie
CUR	<u>C</u> urtain Gas
CYP450	Cytochrom P450
d	Dublett
dd	Doppeldublett
d.h.	das heißt
DMSO(-d ₆)	(Hexadeutero-)Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DP	<u>D</u> eclustering <u>P</u> otential, variable Spannung am API 2000
dt	Doppeltriplett
EP	<u>E</u> ntrance <u>P</u> otential, variable Spannung am API 2000
EROD	Ethoxyresorufin-O-deethylase
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
FIA	Fließinjektionsanalyse
FP	<u>F</u> ocusing <u>P</u> otential, variable Spannung am API 2000
h	Stunden
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high pressure chemical ionization</i>)
IC ₅₀	Konzentration einer Substanz, die eine Wachstumshemmung einer Zellkultur um 50 % im Vergleich zur Kontrolle bewirkt
IC ₇₀	Konzentration einer Substanz, bei der die Anzahl der Kolonien um 70 % gehemmt wird oder die Anzahl der Kolonien in den behandelten Proben nur noch 30 % von der Kontrolle beträgt
IS	<u>I</u> onspray Voltage, variable Spannung am API 2000
i.p.	<u>i</u> ntraperitoneal (in die/ in der Bauchhöhle)
i.v.	<u>i</u> ntravenös
k.H.	keine Hemmung
L7212	Leukämiezelllinie
LXFL	humaner Tumorexograft: großzelliges Lungenkarzinom
min	Minuten
M	mol pro Liter
mM	10 ⁻³ mol pro Liter
µM	10 ⁻⁶ mol pro Liter
MS	Massenspektrometrie

MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NADPH	β -Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (reduzierte Form)
n.b.	nicht bestimmt
PKA	Proteinkinase A, cAMP-abhängige Kinase
PKG	Proteinkinase G, cGMP-abhängige Kinase
R _f	engl. <i>ratio of fronts</i> , in der Dünnschichtchromatographie: Quotient aus der Entfernung (Start – Substanzfleck (Mitte)) und der Entfernung (Start – Lösungsmittelfront)
RP	Umkehrphase
RSA	Röntgenstrukturanalyse
RT	Retentionszeit
s	Singulett
SRB	Sulforhodamin B
t	Triplet
u	Units, Peakflächeneinheit
UV	ultraviolett
W256	maligne Zelllinie (Walker Karzinomsarkom)
W258	maligne Zelllinie (Walker Karzinomsarkom)

Aminosäuren und ihre Symbole

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

1 Einleitung

Krebs hat die Menschheit seit jeher heimgesucht und ist nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Jährlich erkranken nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts fast 400.000 Menschen in Deutschland neu an Krebs. Im Jahr 2003 starben knapp 210.000 an den Folgen einer Krebserkrankung [Robert Koch-Institut, 2004].

Krebs ist keine einzelne Krankheit sondern besteht aus einer Gruppe verschiedenster Störungen. Die drei massivsten Grundeigenschaften dieser Störungen des Gewebes sind:

1. die ungebremste Vermehrungsfähigkeit der entarteten Zellen,
2. die Fähigkeit in das umgebende normale Gewebe einzudringen (Invasion),
3. der Möglichkeit sich im Körper auszubreiten und Metastasen zu bilden.

Zu den ältesten Behandlungsmethoden von Krebs gehören die operative Entfernung sowie die lokale Bestrahlung. Als Nachteil besitzen diese beiden Behandlungsmethoden, dass nichtlokalisierte Tumore (z.B. Leukämie und Lymphome) oder Metastasen, die durch die Absiedlung von Zellen aus den Primärtumoren entstehen, nicht bekämpft werden können. In solchen Fällen findet die Chemotherapie - die Verabreichung von Medikamenten, die sich über die Blutbahn im gesamten Körper verteilen – seit den vierziger Jahren ihren Einsatz.

Die Chemotherapie basiert, identisch zur Bestrahlungstherapie, auf der höheren Empfindlichkeit sich rasch teilender Zellen gegenüber Störungen wobei die meisten eingesetzten antineoplastischen Substanzen, ähnlich wie gewisse Antibiotika auf Bakterien, zytostatisch auf die Zellen wirken. Eine Auswahl der gebräuchlichsten Zytostatika (vom griechischen *Cyto* = Zelle und *statik* = anhalten) ist in Tabelle 1.1 wiedergegeben.

Tabelle 1.1: Auswahl an verschiedenen Zytostatika

Bezeichnung	Mechanismus	Substanz
Alkylantien	Übertragung von Alkylgruppen auf die DNA. Können DNA-Stränge verknüpfen und dadurch verhindern, dass diese korrekt während der Zellteilung verdoppelt wird.	Stickstoff-Lost-Derivate Alkylsulfonate Nitrosoharnstoffe Temozolomid Thiotepa
Platinanaloga	Quervernetzung der DNA durch kovalente Bindung des Pt-Atoms an zwei Nukleinbasen	Cisplatin Carboplatin Oxaliplatin
Interkalantien	Binden nichtkovalent an die DNA und verhindern die Anbindung der Polymerasen, die zur Replikation und Transkription der Erbsubstanz dienen.	Anthracycline Mitoxantron Amsacrin
Mitosehemmer	Beeinträchtigen auf verschiedene Weisen den Ablauf der Mitose	u.a. Alkaloide der Vinca rosea (Vincristin usw.)
Topoisomerasehemmer	Topoisomerasen (I u. II) sind Enzyme, die gezielte Unterbrechungen im DNA-Strang herstellen. Die Hemmung bewirkt irreguläre, nicht behebbare DNA-Brüche und Vernetzungen.	Camptothecin Topotecan Etoposid Teniposid
Antimetabolite	Werden als falsche Bausteine in die DNA und RNA eingebaut oder verhindern den Einbau der korrekten Bausteine und stören so die Zellteilung.	Folsäureantagonist Pyrimidinanaloga Purinanaloga

Alle bekannten Zytostatika besitzen den Nachteil, dass sie eine geringe Selektivität aufweisen. Neben Tumorgewebe wird auch gesundes Gewebe mit hoher Proliferationsrate wie Knochenmark, Magen-Darm-Epithel, Haut und Haarfollikel, angegriffen. Als zusätzlich problematisch erwies sich die Entwicklung einer Resistenz gegen verabreichte Medikamente und Chemotherapeutika (Multidrug-Resistenz).

Das Hauptziel der Forschung ist es neue antineoplastische Substanzen zu finden, die gesunde Zellen möglichst nicht beeinträchtigen, nicht zur Multidrug Resistenz führen und somit eine selektive Tumorthherapie ermöglichen.

Ein viel versprechender Forschungsansatz zur Entwicklung neuer Zytostatika ist die Beeinflussung des Signalnetzwerks in und zwischen den Zellen. In Tumorzellen sind Onkogene aktiviert und Tumorsuppressorgene deaktiviert, wodurch das Regelwerk der Zellteilung, geregelt durch Signalkaskaden, im Vergleich zu gesunden Zellen erheblich

gestört ist. Somit ist die Beeinflussung der außer Kontrolle geratenen Signalübertragung auf der Ebene der Proteinkaskade ein wirksamer Angriffspunkt für neue antineoplastische Wirkstoffe.

Über die letzten Jahren wurden auf der Suche nach Naturstoffen antineoplastische Verbindungen gefunden, wie z.B. Taxole und Vinca-Alkaloide die als Leitstruktur neuer Wirkstoffe dienen.

Speziell Pflanzen der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) wurden in den letzten drei Jahrzehnten auf ihr pharmakologisches Potenzial untersucht.

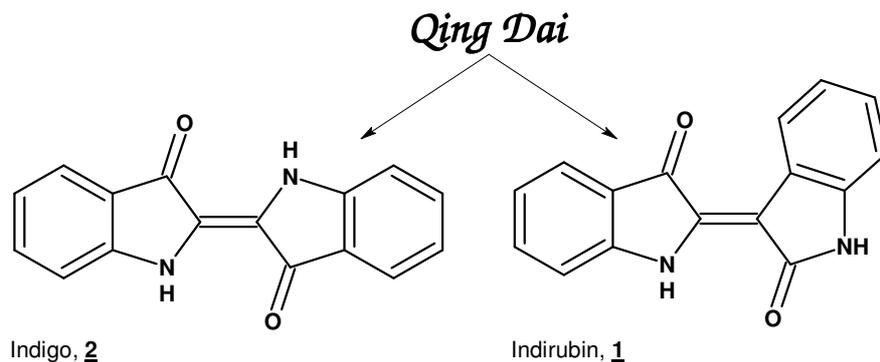


Abbildung 1.1: Strukturformeln der Hauptkomponenten des Qing Dai: Indigo 2 und Indirubin 1 [Damiens et al., 2001]

Die Entdeckung des Indirubins 1, ein 3,2'-Bisindol (Abb. 1.1), ist auf eine aus der traditionellen chinesischen Medizin bekannte Pflanzenrezeptur (*Danggui Longhui Wan*) zurückzuführen. Sie wurde und wird in der TCM zur Behandlung von chronischen Erkrankungen, u.a. chronisch myeloischer Leukämie (CML) eingesetzt, wobei die antileukämische Wirkung der Rezeptur auf einer einzigen pflanzlichen Zutat basiert, dem *Qingdai* oder *Indigo naturalis* [Li, 1987; Tang und Eisenbrand 1992; Han 1994, Pharmacopeia Sinica, 2000]. *Indigo naturalis* wird in der traditionellen chinesischen Medizin als Hämostatikum, Antipyretikum, Antiphlogistikum, Sedativum sowie zur Behandlung bakterieller und viraler Infektionen verwendet [Tang und Eisenbrand, 1992; Pharmacopeia Sinica, 2000]. Das blauschwarze Pulver, das aus den Blättern verschiedener Pflanzen gewonnen wird besteht hauptsächlich aus dem blauen Farbstoff Indigo 2 (Abb. 1.1). Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass nicht Indigo 2 als Hauptbestandteil des *Indigo naturalis* für die antileukämische Wirkung verantwortlich ist, sondern ein Nebenbestandteil, das rote 3,2'-Isomer – das Indirubin 1 [Wu et al., 1980; Zheng et al., 1979a; Zheng et al., 1979b; Han 1988; Tang und Eisenbrand 1992; Han 1994]. Der eigentliche Wirkmechanismus blieb jedoch noch unklar.

2 Grundlagen

2.1 *Indirubine*

2.1.1 Untersuchungen zur Wirksamkeit und Toxizität in früheren Studien

Die Wirksamkeit von Indirubin **1** wurde in einer Studie an 314 Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) untersucht. Dabei bewirkte Indirubin bei einer oralen Dosis von 150-450 mg pro Tag eine komplette Remission bei 82 Patienten (26%), eine partielle Remission bei 105 Patienten (33%) und eine Verbesserung des Zustandes bei 28% der Fälle. Besonders auffallend waren die geringe Toxizität und die geringen Nebenwirkungen [Gan et al., 1985].

Weitere Untersuchungen zur Toxizität wurden mit unterschiedlichen Dosierungen an Ratten durchgeführt. Es konnte weder eine Beeinflussung der Stammzellen der Blutbildung noch der DNA-Bildung gefunden werden. Ebenfalls konnte keine Veränderung des Knochenmarks noch einen Effekt auf Leber oder Niere beobachtet werden. [Ji et al., 1981; Wan et al. 1981]

Untersuchungen an Hunden mit täglichen Dosen von 200 mg/kg, was etwa der 25 fachen Dosis der Humantherapie entspricht, über 6 Monate zeigten eine reversible Diarrhöe sowie eine dosisabhängige Hepatotoxizität. Eine Beeinflussung des Knochenmarks, der Blutwerte und der Nierenfunktion konnte nicht festgestellt werden [Wan et al. 1981]. Indirubin **1** besitzt somit in niedrigen Dosen keine gravierenden Nebenwirkungen.

Untersuchungen zum Wirkmechanismus in den 80iger Jahren zeigten, dass Indirubin nur eine schwache Bindungsfähigkeit an die DNA besitzt, jedoch die DNA- und Proteinsynthese in verschiedenen Zelllinien [Wu et al., 1980] und in einem zellfreien Assay hemmt [Zhang et al., 1985]. Des weiteren bewirkte Indirubin *in vivo* unter anderem eine Hemmung des Walker Karzinom 256 in Ratten [Wu et al., 1980; Ji et al., 1981; Chang und But 1996].

In unserer Arbeitsgruppe konnte in Zusammenarbeit mit L. Meijer und J. Endicott gezeigt werden, dass Indirubin **1** sowie Indirubin-Derivate hochwirksame Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen (CDK) sind. [Hössel et al., 1999a]

2.1.2 Röntgenstrukturanalyse von Indirubin-Derivaten

Durch Co-Kristallisation von Indirubin-5-sulfonat **3** und Indirubin-3'-oxim **4** mit CDK2 gelang es in Zusammenarbeit mit Jane Endicott das Bindungsmuster und somit eine Erklärung für den Wirkmechanismus der Indirubine auf die CDK zu finden. Der katalytischen Kern der CDK2 kann aufgrund der hohen Homologie unter den CDKs stellvertretend für alle CDKs betrachtet werden, insbesondere für CDK1 mit einer Sequenzhomologie von 65 % zu CDK2 [Meyerson et al., 1992].

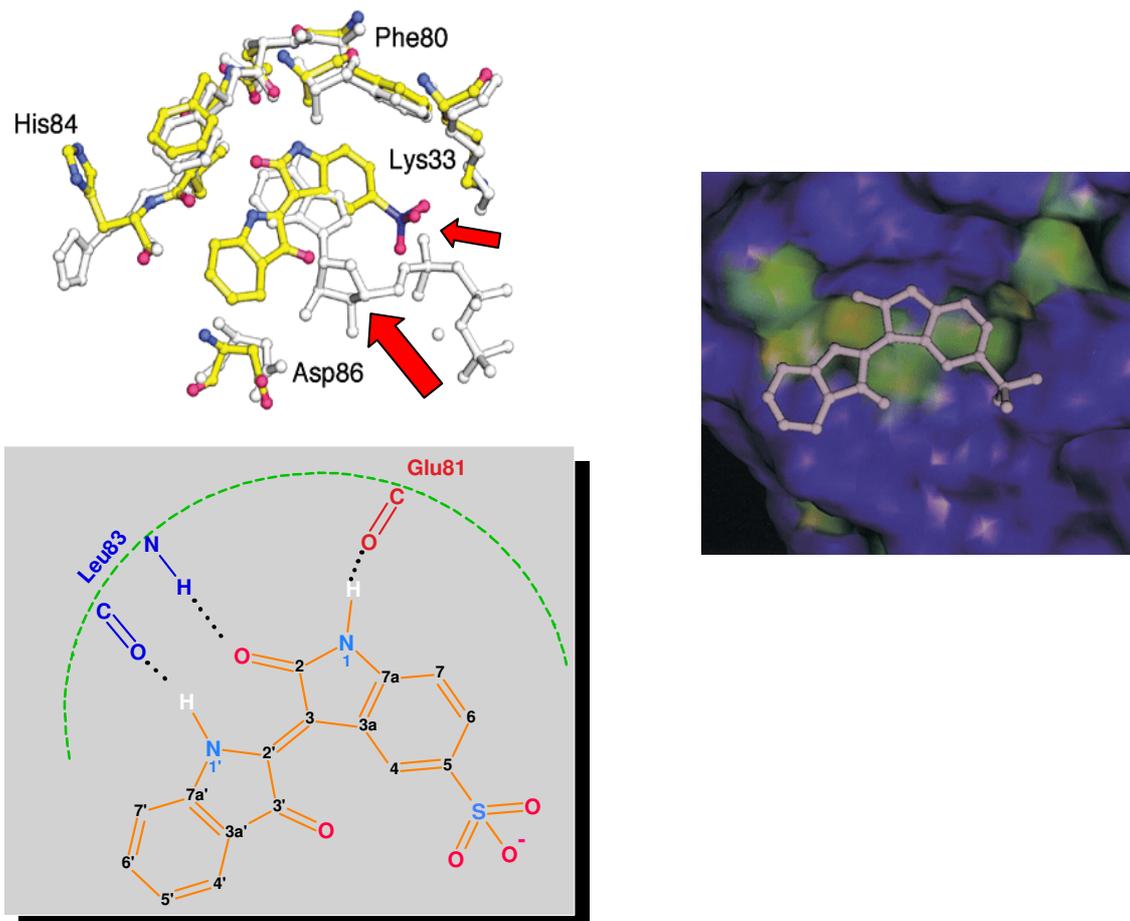


Abbildung 2.1: Überlagerung der Bindungsstruktur von Indirubin-5-sulfonat **3** (gelb) und AMPPNP (weiß) in CDK2/Cyclin A (oben links); Oberflächenanalyse von CDK2/Cyclin A, Hydrophobe Regionen sind grünlich dargestellt (rechts) schematische Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen **3** und der CDK2 (unten links). [Hössel et al., 1999a; Davis et al., 2001]

Aus den Röntgenstrukturanalysen der CDK2 und den beiden Indirubin-Derivaten, Indirubin-5-sulfonat **3** (Abb. 2.1) und mit Indirubin-3'-oxim **4** (Abb. 2.2) geht hervor, dass dies ähnlich dem ATP planar in die ATP-Bindungstasche der katalytischen Region (hinge-Region), zwischen der N-terminalen und C-terminalen Domäne der CDK, binden (s. Abb. 2.1, oben links). Das Indirubingrundgerüst von Indirubin-5-sulfonat **3** und Indirubin-3'-oxim **4** ist räumlich nahezu identisch angeordnet. Es bildet mit den Aminosäuren der hinge-Region drei

Wasserstoffbrückenbindungen aus. Sie bilden sich zwischen dem Hauptkettensauerstoff Glu81 mit dem Wasserstoff des Lactam-Stickstoffs N(1), vom Wasserstoff der Amidgruppe des Leu83 zum Lactamsauerstoff C(2) des Indirubins und vom Wasserstoff an N(1') zum Sauerstoff von Leu83 (s. Abb. 2.1, unten links und Abb. 2.2). Von großer Bedeutung für die Bindung an das Enzym sind die vielen lipophilen Kontakte (s. Abb. 2.1, rechts) mit der ATP-Bindungstasche wie z.B. die aromatische Wechselwirkung zwischen dem planaren Indirubinringsystem und der Phenylgruppe von Phe80, einen Hauptbeitrag zur Indirubin-CDK-Bindung .[Davies et al., 2001]

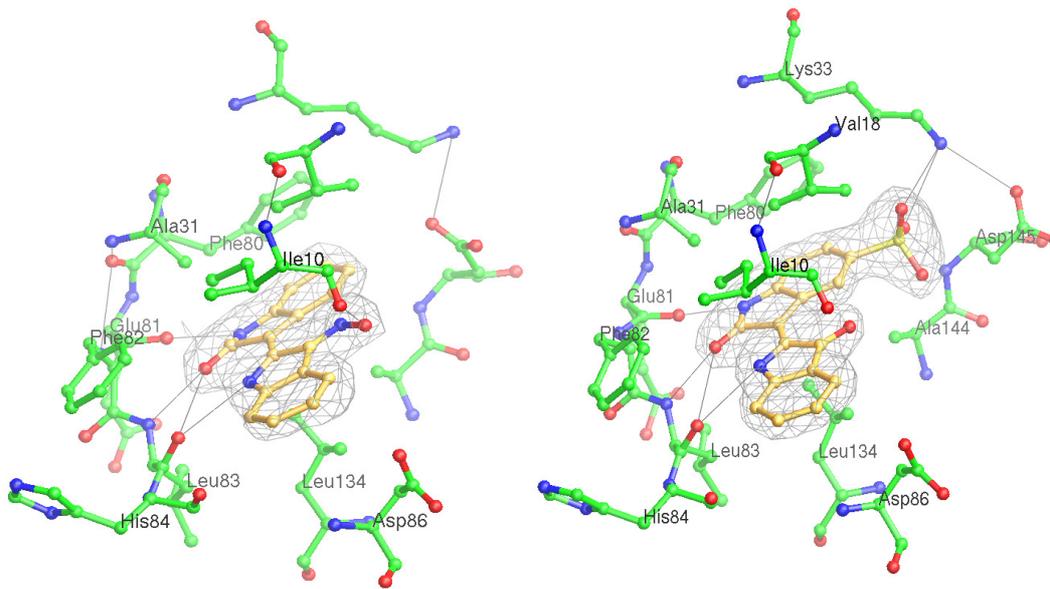


Abbildung 2.2: RSA der ATP-Bindungstasche von CDK2 mit Indirubin- 3'-oxim **4** und Indirubin-5-sulfonat **3** (Hössel et al., 1999a)

Bindet die Cyclin-Box von Cyclin A an die PSTAIRE-Helix der CDK2, kommt es zu einer Umkonfigurierung der CDK. Durch die Cyclin-Bindung wird die T-Schleife aus dem Eingangsbereich entfernt und die aktive Spalte, die hinge-Region aufgeweitet. Diese strukturelle Umkonfiguration besitzt jedoch keinen Einfluss auf die Bindung zwischen Indirubin und der ATP-Bindungstasche. Einzig wird der Ribose-Bereich des ATPs dem Lösungsmittel freigesetzt. [Davies et al., 2001]

Aus den Untersuchungen geht hervor, dass das Indirubingerüst zwei Bereiche besitzt, an denen durch Derivatisierung die Eigenschaften des Indirubins, sowie die Bindung zwischen Inhibitor und CDK beeinflusst werden können (s. Abb. 2.1, rote Pfeile). Der Bereich der Position 5 des Indirubingerüsts, die Region entspricht der α -Phosphatgruppe von ATP [Davies et al., 2001], scheint besonders zur Einführung von sterisch kleinen Gruppen geeignet zu sein. Diese können durch ionische Bindungen, wie bei Indirubin-5-sulfonat **3** beobachtet, mit der

ω -Amino-Gruppe von Lys33 in Wechselwirkung treten und somit das Bindungsmuster von ATP genauer nachahmen [Davies et al., 2001].

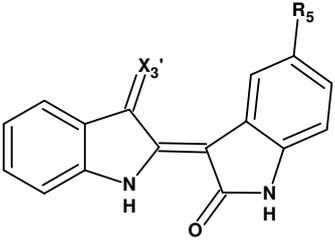
Der zweite Bereich ist der Bereich der 3'-Position des Indirubins. Er entspricht dem durch Cyclin-Anlagerung freigesetzte Ribose-Bereich des ATPs und ist somit ein guter Bereich zur Einführung von sterisch anspruchsvollen Substituenten an das Indirubingerüst.

2.1.3 Indirubine als CDK-Inhibitoren und Tumorstoffe

Indirubin **1** und seine Derivate zeigen eine effektive Hemmwirkung auf die Enzymkomplexe CDK1/Cyclin B, CDK2/Cyclin A, CDK5/p25 und CDK4/Cyclin D1. Durch Derivatisierung des Indirubins, insbesondere in Position 3' und 5 konnte eine Steigerung der Inhibierungsfähigkeit erreicht werden. Indirubin **1** hemmt CDK1/Cyclin B mit einem IC_{50} -Wert von 10 μ M, wohingegen die Einführung einer Oximfunktion in Position 3' (**4**) eine Steigerung der Hemmwirkung um einen Faktor von 50 bewirkt (Tabelle 2.1). Modifikationen in Position 5 wie z.B. eine Halogensubstitution führen bis zu einer Steigerung der Hemmwirkung um das 45-fache (**5**, 5-Iodindirubin CDK1/Cyclin B, $IC_{50} = 0,22 \mu$ M), bei Indirubin-5-sulfonat (**3**) um das 200-fache (CDK1/Cyclin B, $IC_{50} = 0,05 \mu$ M). [Hössel, 1999b; Thommet 2001]

Die von Hössel und Thommet synthetisierten 5-Alkyl-Indirubine (u.a. **6**, **7**) hemmen die CDK-Komplexe CDK1/Cyclin B und CDK2/Cyclin E besser als Indirubin **1** wobei mit zunehmender Kettenlänge die hemmende Wirkung geringer wird. Die 5-Alkylindirubin-3'-oxime (z.B. **8**, **9**) ergaben eine Hemmwirkung die zwischen 5-Alkylindirubinen und Indirubin-3'-oxim **4** liegt. Der Einbau von Alkyl-Ketten mit Hydroxy-Gruppen an der 3'-Position (**10**, **11**) bewirkt bei der CDK1/Cyclin B eine leicht geringere, jedoch bei CDK2/Cyclin E höhere Wirksamkeit wie die Leitsubstanz Indirubin-3'-oxim **4**. Indirubin-3'-oximether-Derivate mit Essigsäureamid-Ketten (z.B. **12**) übertreffen die Hemmwirkung des Indirubin-3'-oxims **4** an beiden Enzymkomplexen (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Ausgesuchte Indirubin-Derivate und ihre Hemmwirkung auf CDK1/Cyclin B- und CDK2/Cyclin E-Komplexe sowie auf die Tumorzelllinie MCF-7 [Hössel 1999b, Thommet 2001, Schwahn 2004]

					
Nr.	X _{3'}	R ₅	CDK1/Cyclin B IC ₅₀ [μM]	CDK2/Cyclin E IC ₅₀ [μM]	MCF-7 IC ₅₀ [μM]
1	O	H	10	2	4
5	O	I	0,22	7	7
3	O	SO₃Na	0,05	0,6	>30
6	O	Me	0,3	3	1
7	O	CHMe ₂	2,8	k.H	0,5
4	N-OH	H	0,2	0,9	3,3
8	N-OH	Me	1,5	1,5	6,2
9	N-OH	CHMe ₂	1	3	5,1
10	N-O-CH ₂ -CH ₂ OH	H	0,3	0,3	2,3
11	N-O-CH ₂ .COH(Me) ₂	H	0,5	0,3	1,5
12	N-O-CH ₂ -CONH ₂	H	0,13	0,15	0,9
13	O	SO ₂ NMe ₂		0,02	>10
14	N-OH	SO ₂ NMe ₂		0,04	0,4

Indirubin-5-sulfonat (**3**) zeigt eine effektive Hemmwirkung am isolierten CDK/Cyclin-Komplex, jedoch keine Wachstumshemmung an der Tumorzelllinie MCF-7. Wird die Sulfonat-Gruppe durch eine *N,N*-Dimethylsulfonamid-Gruppe (**13**) oder auch sterisch größere Amide ersetzt, bleibt die CDK2/Cyclin E-Hemmung im nanomolaren Bereich erhalten. Durch die Derivatisierung von Indirubin-5-dimethylsulfonamid zum 3'-Oxim (**14**) konnte auch die Zytotoxizität (MCF-7; IC₅₀=0,4μM) erheblich verbessert werden bei Erhalt der CDK-Hemmung. [Schwahn 2004; Hössel 1999b]

Erste Untersuchungen an verschiedenen humanen Tumoxenografts im Colony-Forming-Assay, ergaben, dass Indirubin, 5-Iodindirubin, 5-Bromindirubin, 5-Chlorindirubin, 5-

Fluorindirubin und 5-Methylindirubin ein ähnliches Wirkprofil besitzen. Die getesteten Verbindungen zeigten für alle getesteten Zelllinien eine eher geringe durchschnittliche Wirksamkeit ($IC_{70} = 20 - 30 \mu M$) wohingegen sie eine hohe Sensitivität gegenüber der Zelllinie MCF 7X (Brusttumor) ($IC_{70} = 1 \mu M$) besaßen. [Hössel 1999b]

2.1.4 Wasserlöslichkeit und Bioverfügbarkeit der Indirubine

Aus den Daten der Hemmwirkung der Indirubine an aufgereinigten CDK/Cyclin-Enzymkomplexe sowie an Tumorzellen (Kap. 2.1.3) geht besonders am Beispiel des Indirubin-5-sulfonats **3** eine starke Diskrepanz zwischen der Hemmung am isolierten Enzym der CDK (CDK2/Cyclin E, $IC_{50} = 0,6 \mu M$) und der Hemmung im Zytotoxizitätstest (MCF-7, $IC_{50} > 30 \mu M$) hervor. Untersuchungen zur Zellpenetration von Marko et al., 2001 an LXFL-529 Tumorzelllinie zeigten, dass Indirubin-5-sulfonat **3** nicht in die Zelle aufgenommen wird (Tabelle 2.2). Die Zellmembran kann aufgrund der ionischen Struktur von Indirubin-5-sulfonat **3** nicht überwunden werden. Ionische Substanzen können ohne aktiven Transportmechanismus nur schwer in die Zelle bzw., den Zellkern eindringen.

Tabelle 2.2: Zelluläre Aufnahme und Verteilung von Indirubin und Derivaten bei der Tumorzelllinie LXFL-529 [Marko et al., 2001]

Nr.	Verbindung	Zelluläre Aufnahme		Zelluläre Verteilung	
		Inkubation [μM]	Substanzgehalt [$\mu g/mg$ Protein]	Cytosol [%]	Particular [%]
1	Indirubin	20	$0,20 \pm 0,08$	6 ± 1	94 ± 1
6	5-Methylindirubin	20	$0,86 \pm 0,22$	$6 \pm 2,8$	$94 \pm 2,8$
4	Indirubin-3'-oxim	20	$0,23 \pm 0,03$	44 ± 16	56 ± 16
8	5-Methylindirubin-3'-oxim	20	$0,12 \pm 0,02$	$20 \pm 5,7$	$80 \pm 5,7$
3	Indirubin-5-sulfonat	20	$<0,02$	n.d.	n.d.
		50	$<0,02$	n.d.	n.d.

Von Indirubin **1** und Indirubin-3'-oxim **4** sowie 5-Methyl-indirubin **6** und 5-Methyl-indirubin-3'-oxim **8** wurden Aufnahme in die Zelle und zelluläre Verteilung bestimmt. Es konnte bei einer Inkubation der Tumorzelllinie LXFL-529 mit je $20 \mu M$ des jeweiligen Indirubin-Derivats (Tabelle 2.2) gezeigt werden, dass Indirubin **1** und Indirubin-3'-oxim **4** gleich gut in die Zelle aufgenommen wurden ($0,2 \mu g/mg$ Protein) wobei für Indirubin-3'-

oxim **4** eine höhere Aufnahme ins Cytosol der Zelle (44% im Cytosol für **4** und 6% für **1**) festgestellt wurde.

5-Methyl-indirubin **6** zeigte mit einem Substanzgehalt von 0,86 µg/mg Protein die höchste zelluläre Aufnahme der getesteten Verbindungen. Mit einem Anteil von 6 % im Cytosol liegt die absolute Aufnahme im Cytosol in der gleichen Größenordnung wie die des Indirubin-3'-oxims **4**. Auffällig in diesem Fall ist, dass die Derivatisierung von **6** zum 5-Methyl-indirubin-3'-oxim **8** eine Verschlechterung der zelluläre Aufnahme bewirkte.

Aus den Daten geht hervor, dass besonders im Hinblick auf eine gute cytosolische Aufnahme neue Indirubin weder die Lipophilie von Indirubin **1** noch die Polarität des Indirubin-5-sulfonats **3** besitzen dürfen. Zusätzlich ist die hohe zelluläre Aufnahme von 5-Methyl-indirubin **6** besonders interessant.

2.1.5 Neue Indirubine mit hydrophilen Substituenten-CDK-Inhibition und Wachstumshemmung

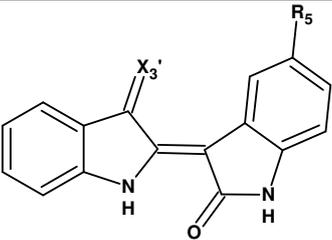
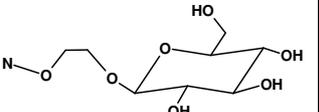
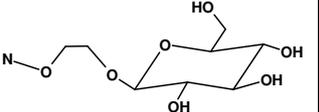
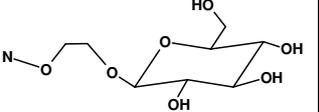
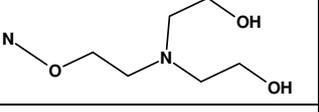
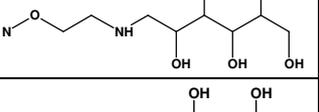
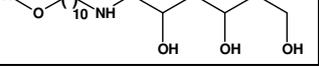
Zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit wurden Glycoside, die über ein Spacer an das Oxim-O-Atom in 3'-Position gebunden sind, mit und ohne Substitution in Position 5 synthetisiert [Schwahn, 2004]. Die erhaltenen glycosidischen Inirubin-3'-oximether (Tabelle 2.3, **15**, **16**, **17**) erreichten, je nach Substitution in Position 5, eine Wasserlöslichkeit von 2-23 mg/l ohne ihre Hemmwirkung am isolierten Enzym zu verlieren (CDK2/Cyclin E; $IC_{50} = 0,08-0,15\mu M$). Als Beispiel soll hier der 5-Methyl-indirubin-3'-(2-β-D-glucopyranosylethyl)oximether **16** (Tabelle 2.3) erwähnt werden. Die nicht glycosidische Verbindung 5-Methylindirubin **6** besitzt eine CDK2/Cyclin E-Hemmung von $IC_{50} = 3\mu M$, eine Wasserlöslichkeit von 0,1 mg/l und eine durch die geringe Wasserlöslichkeit bedingte schlechte Hemmung der Tumorzelllinie MCF-7 von $IC_{50} > 10\mu M$. Durch die Derivatisierung zum glycosidischen Oximether **16** konnte eine Wasserlöslichkeit von 3 mg/l erreicht werden, die CDK2/Cyclin E-Hemmung um den Faktor drei verbessert werden ($IC_{50} = 0,15\mu M$) und für die Tumorzelllinie MCF-7 konnte ein IC_{50} -Wert von 0,3 µM erreicht werden.

Die Verbindung **17** zeigte als einzige der drei glycosidischen Verbindungen keine Hemmwirkung mehr an der Tumorzelllinie MCF-7 ($IC_{50} > 10\mu M$) neben einer guten Inhibition am isolierten Enzym ($IC_{50} = 0,08\mu M$). Es wurde diskutiert, dass **17** sterisch zu aufwendig für einen aktiven Transport in die Zelle ist [Schwahn 2004].

Anhand der berechneten Konformation von CDK2 mit Indirubin-3'-(2- β -D-glucopyranosylethyl)oximether **15** konnte gezeigt werden, dass der glycosidische Oximether den konformationellen Raum des ATPs in der Bindungstasche optimal ausfüllt.

Wurde Glucose durch Maltose ersetzt zeigte sich ein kompletter Verlust der CDK-Inhibition, was wahrscheinlich auf die Größe der Maltose zurückzuführen ist, die nicht mehr in die ATP-Bindungstasche passt [Schwahn 2004].

Tabelle 2.3: Ausgesuchte Indirubin-Derivate und ihre Hemmwirkung auf CDK2/Cyclin E-Komplexe sowie auf die Tumorzelllinie MCF-7 [Hössel 1999b, Schwahn 2004]

				
Nr	X _{3'}	R ₅	CDK2/Cyclin E IC ₅₀ [μ M]	MCF-7 IC ₅₀ [μ M]
3	O	SO ₃ Na	0,6	>30
13	O	SO ₂ NMe ₂	0,02	>10
14	N-OH	SO ₂ NMe ₂	0,04	0,4
15		H	0,1	1,2
16		Me	0,15	0,3
17		SO ₂ NMe ₂	0,08	>10
18		H	0,5	0,2
19		H	0,8	15
20		H	k.H.	2

Der Alkylamino-indirubin-3'-oximether mit einer N-Bis(hydroxyethyl)aminogruppe in Position 3' (**18**) zeigte ebenfalls gute Hemmung am CDK2/Cyclin E-Komplex (IC₅₀=0,5 μ M)

und an der Tumorzelllinie MCF-7 ($IC_{50} = 0,2 \mu M$). Das in dieser Reihe ebenfalls synthetisierte polare Indirubin-3'-(2-N-(1-deoxyglucitol)aminoethyl)oximether (**19**) zeigt eine gute Enzyminhibition mit einem IC_{50} -Wert von $0,8 \mu M$ wobei die MCF-7-Zelllinie nur gering gehemmt ($IC_{50} = 15 \mu M$) wurde. Die Verbindung **20** mit dem längerem Decylspacer hemmt zwar noch das Tumorstadium von MCF-7-Zellen, zeigt jedoch am isolierten Enzym CDK2/Cyclin E keine Hemmung mehr.

Indirubine zeigen neben einer Inhibierung der diskutierten CDK1/Cyclin B und CDK2/Cyclin E-Enzymkomplexe ebenfalls eine Inhibierung der CDK2/Cyclin A und CDK4/Cyclin D1. Werden diese Enzym-Komplexe gehemmt, so wird pRb nicht phosphoryliert und somit kommt es zu einer Blockierung der E2F-Transkriptionsfaktoren und die Zelle wird in der G1/S-Phase arretiert. So konnte für Indirubin-3'-oxim **4** und Indirubin-3'-(2- β -D-glucopyranosylethyl)oximether **15** ein Rückgang der Phosphorylierung des Retinoblastomprotein an Ser807/811 in Jurkat- (**4**) und LXFL-529XL (**15**) Zellen beobachtet werden. Ein konzentrationsabhängiger Rückgang der Hyperphosphorylierung von pRB an drei für CDK4/Cyclin D charakteristischen Phosphorylierungsstellen (Ser780, Ser 795, Ser 807/811) konnte ebenfalls nachgewiesen werden. [Eisenbrand et al., 2004]

2.1.6 *In vivo* Tests

In einem *in vivo*-Versuch an athymen Nacktmäusen mit subkutan implantierten Tumorenograft des humanen großzelligen Lungenkarzinom LXFL529 wurden die Substanzen Indirubin **1**, 5-Chlorindirubin und 5-Methylindirubin **6** untersucht. Die Substanzgabe erfolgte intraperitoneal (i.p.) als Suspension in verschiedenen Dosierungen (100-300 mg/kg Tag). Es zeigte sich, dass alle drei Substanzen eine Hemmung des Tumorstadiums bewirkten.

In dem über 30 Tage durchgeführten Versuch, zeigten Indirubin und 5-Chlorindirubin ein identisches Hemmverhalten, wohingegen 5-Methylindirubin ab Tag zehn eine deutlich, im Vergleich zu den anderen beiden Verbindungen, stärkere Hemmung zeigte. 5-Methylindirubin bewirkte, als einzige der getesteten Verbindungen, ab Tag zehn ein Stillstand des Tumorstadiums. [Hössel, 1999b]

2.2 CDKs - Regulatoren des Zellzyklus

2.2.1 Der Zellzyklus

Die Vermehrung von eukaryontischen Zellen läuft nach einem Muster ab, welches wegen seiner rhythmischen Wiederholbarkeit als Zellzyklus bezeichnet wird. Er besteht neben einer Ruhephase G₀ aus vier verschiedenen Aktivitätsphasen, die G₁-, S-, G₂- und M-Phase (Abb. 2.3). [Morgan, 1997; Murray, 2004]

Der Zellzyklus beginnt mit der G₁-Phase aus welcher die Zelle in die G₀-Phase, eine Art Ruhezustand der Zelle, oder direkt in die S-Phase übergehen kann. Wird die Zelle in der G₀-Phase erneut aktiviert so kehrt sie in die G₁-Phase zurück, aus der sie in die S-Phase übergeht und den Zellzyklus fortsetzt. In der S-Phase (S für Synthese) wird die Teilung der Zelle in zwei Tochterzellen vorbereitet und die DNA des Zellkerns repliziert. Die anschließende G₂-Phase ist eine Art Sicherheits-Pause der tetraploiden Zelle. Nach Überprüfung der vollständigen Verdoppelung der DNA geht die Zelle in die letzte Phase des Zellzyklus über, die M-Phase. Die M-Phase (M für Mitose) steht für die eigentliche Teilung der Zelle. Ist die M-Phase abgeschlossen, liegen zwei diploide Tochterzellen vor, die den Zellzyklus wieder mit der G₁-Phase beginnen können. [Alberts, 1995]

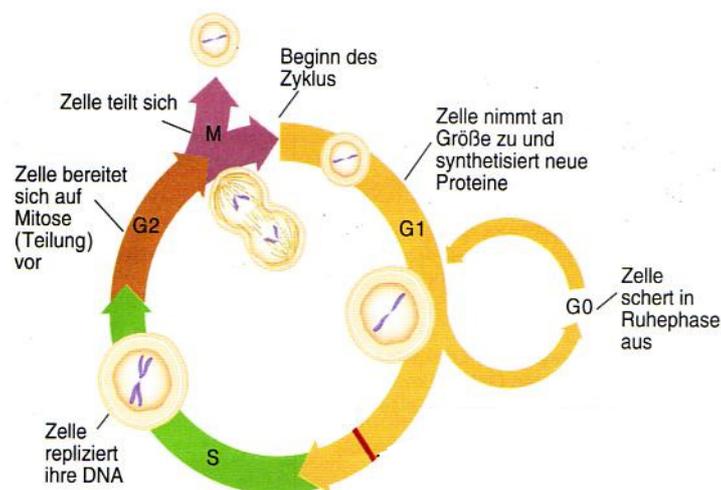


Abbildung 2.3: Zellzyklus einer eukaryontischen Zelle mit Ruhephase G₀, den Zwischenphasen G₁ und G₂, der Synthese-Phase S und der Mitose-Phase M. [Weinberg, 1999]

Der korrekte Ablauf des Zellzyklus ist für einen Organismus lebenswichtig. Eine Zelle besitzt deshalb eine Reihe von Kontrollmechanismen, die den korrekten Ablauf des Zellzyklus überwachen und zu denen die Cyclin-abhängigen Kinasen (cyclin-dependent kinases, CDKs) gehören.

2.2.2 CDKs – Funktion, Aufbau und Struktur

CDKs sind Proteinkinasen die Phosphatgruppen aus Adenosintriphosphat (ATP) auf Serin- und Threonin- oder Tyrosinseitenketten anderer Proteine übertragen und damit deren Aktivität steuern. Bevorzugt werden von den CDKs Serin- und Threoninreste phosphoryliert die in Nachbarschaft eine dirigierende Prolinseitenkette besitzen [Leclerc et al., 2001; Sielecki et al. 2000].

Der geordnete Ablauf des Zellzyklus wird durch sequenzielle Aktivierung von CDK/Cyclin-Komplexe gesteuert, wobei die katalytische Untereinheit aus der CDK besteht, die von der Cyclin-Untereinheit reguliert wird. Je nach Phase des Zellzyklus ist eine Zu- oder Abnahme der Cyclin-Konzentration in der Zelle zu beobachten, während die Konzentration der meisten CDKs relativ konstant bleibt. [Motokura und Arnold, 1993; Morgan 1995 und 1997; Sielecki et al., 2000]

Zurzeit sind 10 humane CDKs (1-10) und mehr als zwölf verschiedene Cyclin-Familien (A-I, K, T) beschrieben [Barvian et al., 2000] von denen nur bestimmte Kombinationen gefunden werden. In unterschiedlichen Bereichen des menschlichen Organismus üben diese Enzyme unterschiedliche Funktionen aus. Es gibt CDKs mit regulatorischen Aufgaben im Zellzyklus (CDK1-4, 6 und 7), mit neuronalen Funktionen (CDK5) und solche die direkt an der Transkription beteiligt sind (CDK7-9) [Gray et al., 1999; Rosania und Chang 2000; Knockaert et al., 2000 und 2002]

Die Struktur der CDKs soll in Folgendem an der CDK2 (Abb. 2.4) besprochen werden. Sie gehört mit 33,9 kDa zu den kleineren Enzymen, die kaum mehr als den katalytischen Kern der Proteinkinase enthält wobei der katalytische Kern eine hohe Homologie bei den verschiedenen Mitgliedern der CDK-Familien aufweist. [Jeffrey et al., 1995]

Der katalytische Kern der CDK lässt sich einteilen in eine N-terminale Domäne (Aminosäuren 1-85), die zum größten Teil aus β -Faltblatt-Strukturen besteht, und eine größere, C-terminale Domäne, die

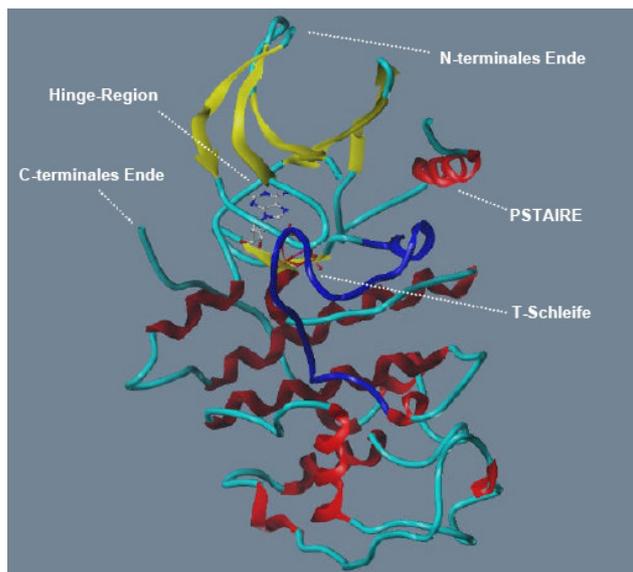


Abbildung 2.4: CDK2 mit gebundenem ATP. α -Helicale Bereiche sind als rote Spiralen, β -Faltblattstrukturen als gelbe Bänder dargestellt. [Berman et al., 2000; Schulze-Gahmen et al., 1996]

wiederum reich an α -Helices ist [Gray et al., 1998; Pavletich, 1999]. Im Bereich der N-terminalen Domäne befindet sich bei den CDKs eine streng konservierte Sequenz, die PSTAIRE-Region (Aminosäuren 44-58). Diese Region gehört zur einzigen α -Helix der N-terminalen Domäne (Abb. 3, rot markiert) und ist für die Bindung der entsprechenden Cycline sowie für die Spezifität dieser Bindung mitverantwortlich. [Morgan, 1996; Pavletich 1999]

In dem Bereich wo beide Domänen miteinander verbunden sind befindet sich eine Spalte in der die katalytische ATP-Bindungsstelle liegt. Die Verbindung entspricht einer Art Scharnier und besteht aus nur wenigen Aminosäuren und wird als hinge-Region bezeichnet.

In der inaktiven, monomeren Form der CDK wird der Zugang zur katalytischen Spalte durch die T-Schleife blockiert in der das Thr160 lokalisiert ist, dessen Phosphorylierung zu einer drastischen Aktivitätssteigerung der CDK2 führt (Thr161 bei CDK1, Thr172 bei CDK4) [Russo et al., 1996].

Ein weiterer Grund für die Inaktivität der monomeren CDK ist, dass ohne Cyclin-Assoziation die Orientierung der ATP-Phosphatkette eine Phosphataspaltung und Übertragung der Phosphatgruppe auf ein Substrat nicht erlaubt. [Morgan 1997]

2.2.2.1 Aktivierung

Zur Aktivierung der CDK2 bindet die Cyclin-Box (verantwortlicher Sequenzabschnitt der Cycline, für die Bindung an CDK) von Cyclin A an die PSTAIRE-Helix der CDK2 und bewirkt eine Umkonfigurierung der CDK [Morgan 1997; Brown et al., 1999; Davies et al., 2001]. Dies bewirkt, dass inhibitorische Teile aus dem katalytischen Zentrum entfernt werden und regulatorische Bereiche einer Phosphorylierung zugänglich gemacht werden. Durch die Cyclin-Bindung wird die T-Schleife aus

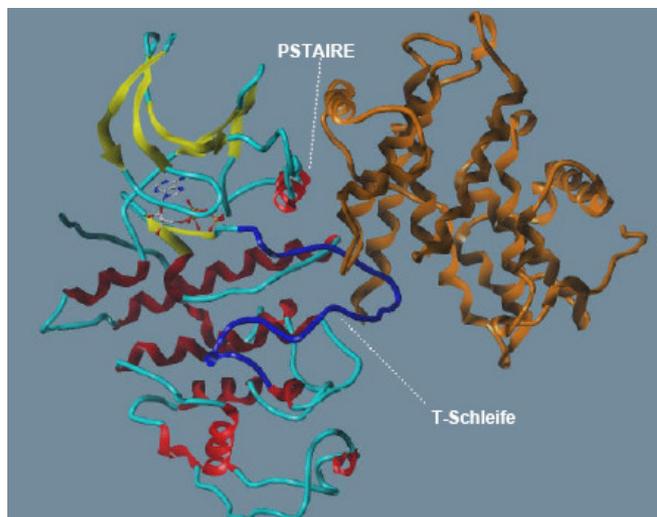


Abbildung 2.5: CDK2/Cyclin A-Komplex mit gebundenem ATP und phosphoryliertem Thr160. CDK2 in gleicher Farbgebung wie in Abb. 3. Cyclin A (rechts) ist braun dargestellt. [Berman et al., 2000; Russo et al., 1996]

dem Eingangsbereich entfernt und die aktive Spalte, die hinge-Region, aufgeweitet (Abb. 2.5). Die PSTAIRE-Helix wird gleichzeitig gedreht und in das katalytische Zentrum geschoben. Dadurch kann das Glu51 der PSTAIRE-Region die Phosphatreste des ATPs

zusammen mit Lys33 und Asp145 neu koordinieren und sie somit in die richtige Position für eine Phosphatübertragung bringen. [Jeffrey et al., 1995; Morgan 1997; Pavletich, 1999]

Auch das Thr160 der T-Schleife liegt jetzt frei und kann von anderen Kinasen phosphoryliert werden, woraus eine enorme Aktivitätssteigerung der CDK2 resultiert. [Jeffrey et al., 1995; Morgan 1997] Die Phosphorylierung bewirkt keine große Änderung der katalytischen Spalte, sondern hat Einfluss auf ein Netz von Wasserstoffbrückenbindungen, die die Stabilisierung der CDK/Cyclin-Bindung, sowie die der CDK/Cyclin-Substrat-Bindung begünstigen [Brown et al. 1999].

Die Phosphorylierung am Thr160 der CDK2 (Thr161 in CDK1, Thr172 in CDK4) wird durch CDK7 ausgeführt, die ebenfalls an der Transkription beteiligt ist. Der CDK7/Cyclin H-Komplex wird deshalb zu den CAK (cdk activating kinases) gezählt. [Borgne und Meijer, 1996; Müller et al. 1995]

2.2.2.2 *Inaktivierung*

Die CDK2 kann durch Phosphorylierung an Thr14 und Tyr15 inaktiviert werden. Sie liegen nach Cyclin-Addition frei und können durch die Kinasen Myt1 (v.a. Thr14, weniger Tyr15) und Wee1 (Tyr15) phosphoryliert werden. Die Proteinphosphatase cdc25 (gehört zu den CAK) kann jedoch die hemmenden Phosphatreste abspalten [Borgne und Meijer, 1996; Müller et al., 1995]. Die Aktivität des CDK/Cyclin-Komplexes ist somit durch Anbringen oder Entfernen von verschiedenen Phosphatresten positiv als auch negativ beeinflussbar. [Draetta und Pagano, 1996]

Die CDKs können außerdem von relativ kleinen, inhibitorischen Proteinen gehemmt werden. Sie bestehen aus zwei verschiedenen Proteinfamilien, der INK4-Familie (CDK4-Inhibitoren) und der CIP- bzw. KIP-Familie (CDK2 Interacting Proteins; Kinase Inhibiting Proteins). [Murray 2004]

Zur INK4-Familie (CDK4-Inhibitoren) gehören zur Zeit vier Mitglieder, das p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C} und p19^{INK4D}. Sie hemmen spezifisch in der G1-Phase CDK4 und CDK6, indem sie an die freie CDK binden und mit den Cyclinen D1-3 kompetitieren. [Sielecki et al., 2000; Rosania und Chang 2000; Pavletich 1999]

Zur CIP-Gruppe zählen bisher drei verschiedene Proteine, das p21^{CIP1}, p27^{KIP1} und p57^{KIP2}. Sie sind an der G1- und G1/S-Kontrolle beteiligt, da sie vor allem CDK2/Cyclin-Komplexe hemmen. [Morgan, 1997; Carnero et al., 1997; Chellappan et al., 1997; El-Deiry et al., 1997]

Die Inhibition verläuft hierbei über Wechselwirkungen mit CDK und Cyclin, indem das CIP-Protein sich wie eine Klammer über den Enzymkomplex legt.

2.2.3 CDKs und Cycline im Zellzyklus

Eine wichtige Rolle in der Verarbeitung externer Signale (Wachstumsfaktoren) besitzen die beiden Kinasen CDK4 und CDK6 im Zusammenspiel mit Cyclin D zu Beginn des Zellzyklus in der G1-Phase (Abb. 2.6 u. 2.7). Die Expression von Cyclin D wird durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren induziert [Pavletich 1999], wodurch CDK4 und CDK6 aktiviert werden und der Zellzyklus initiiert wird. CDK4/Cyclin D und CDK6/Cyclin D phosphorylieren das Retinoblastoma-Protein pRb (Abb. 2.6), was die Freisetzung von an pRb gebundenen E2F-Transkriptionsfaktoren bewirkt und eine Stimulierung der Transkription von Genen, die für den G1/S-Übergang und die S-Phase nötig sind, z.B. die Gene für CDK2, Cyclin A und Cyclin E. [Reed, 1997; Shapiro und Harper, 1999; Sherr und Roberts, 1999; Harbour und Dean, 2000]. Dies hat zur Folge, dass aufgrund der zusätzlichen Cyclin E-Expression die Aktivität von CDK2/Cyclin E steigt und pRb an anderen Stellen phosphoryliert. Somit kommt es zu einer positiven Rückkopplung, die in einer schnelleren Freisetzung der E2F-Transkriptionsfaktoren resultiert und letztlich die S-Phase einleitet (Abb. 2.6).

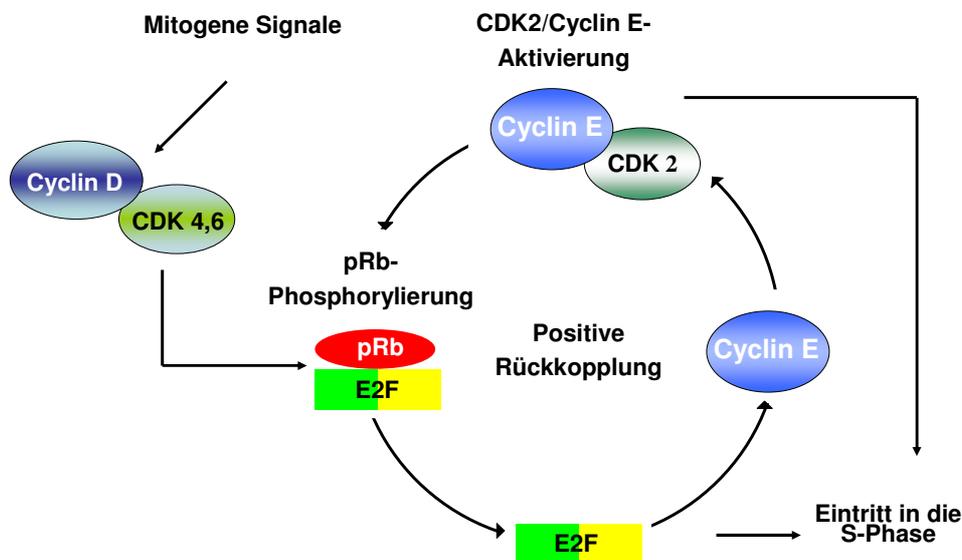


Abbildung 2.6: Positive Rückkopplung. Freisetzung von E2F-Transkriptionsfaktoren beim G1/S-Übergang [Morgan, 1997; Sherr und Roberts, 1999; Thommet 2001]

In der S-Phase sorgt CDK2/Cyclin A dafür, dass die Transkriptionsfaktoren inaktiviert werden, wozu der CDK2/Cyclin E-Komplex nicht in der Lage ist. Somit wird sichergestellt, dass die Transkriptionsfaktoren nicht inaktiviert werden, bevor die S-Phase eingeleitet ist [Morgan, 1997; Shapiro und Harper, 1999; Sherr und Roberts, 1999]. Greift der CDK2/Cyclin E-Komplex aktiv in die Zellzyklusvorgänge ein, erfolgt der Durchlauf des Zellzyklus losgelöst von mitogenen Stimuli.

In der G2-Phase bindet Cyclin A an CDK1 bis die steigende Cyclin B-Konzentration zu einer vermehrten Bildung des CDK1/Cyclin B-Komplexes führt, der den G2/M-Übergang auslöst. Der CDK1/Cyclin B-Komplex ist in aktiver Form für die Phosphorylierung verschiedener an der Mitose beteiligter Proteine verantwortlich [Borgne et al., 1999; Sielecki et al., 2000; Rosania und Chang 2000]. Nach Abschluss der M-Phase liegen zwei diploide Tochterzellen vor, die den Zellzyklus wieder mit der G1-Phase beginnen oder in die G0-Phase (Wachstums- und Differenzierungsphase ohne Zellteilung) eintreten können [Alberts, 1995]. In Abb. 2.7 ist das Vorkommen der jeweiligen CDK/Cylin-Komplexe während des Zellzyklus bildlich dargestellt.

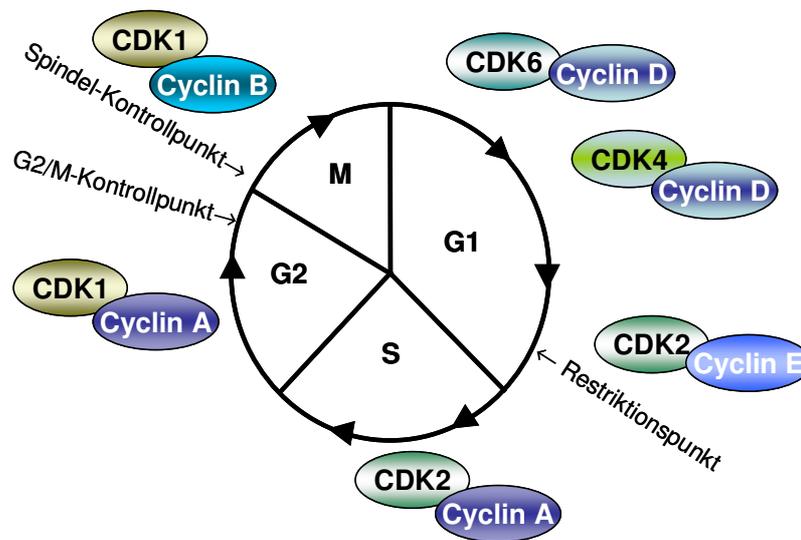


Abbildung 2.7: CDK/Cyclin-Komplexe sowie Kontrollpunkte im Zellzyklus.

Der fehlerfreie Ablauf des Zellzyklus wird an sogenannten Kontrollpunkten überprüft, die sich am Ende der G1-Phase (Restriktionspunkt), in der späten G2-Phase (G2/M-Kontrollpunkt) und in der M-Phase (Spindel-Kontrollpunkt) befinden (Abb. 2.7). Liegt ein Fehler vor so wird die Proliferation angehalten, der Zellzyklus gestoppt. Gelingt es der Zelle durch Reparaturmechanismen die Fehler zu beheben, so wird der Zellzyklus fortgesetzt, wenn nicht, kann es zu einem permanenten Stopp oder zu einem programmierten Zelltod, der Apoptose, kommen. [Kraker und Booher, 1999]

2.2.4 Funktionen von CDK5 und CDK7

Die bisher beschriebenen CDKs besitzen alle eine regulatorische Aufgabe im Zellzyklus (CDK1-4, 6 und 7). Des Weiteren soll hier kurz auf die CDK5 mit neuronaler Funktion und CDK7-9 die direkt an der Transkription beteiligt sind eingegangen werden. [Gray et al., 1999; Rosania und Chang 2000; Knockaert et al., 2000 und 2002]

Die Aktivität von **CDK5** ist im Gehirn am höchsten und ist für das Wachstum von Neuriten und die neuronale Entwicklung von Bedeutung [Gray et al. 1999; Meijer et al., 1999]. Untypischerweise bildet CDK5 in der Regel kein Komplex mit einem Cyclin, sondern mit dem Protein p35 (regulatorische Untereinheit von CDK5) oder mit p25, welches durch proteolytische Spaltung aus p35 entsteht. [Mandelkow, 1999] Eine Verwandtschaft zwischen p35 bzw. p25 und den Cyclinen besteht nicht, d.h. es findet sich hier nicht das typische Aminosäuremuster der Cyclin-Sequenz. Die Affinität zu einer CDK kann allerdings mit einer Cyclin-ähnlichen Faltung des Proteins begründet werden [Gray et al. 1999]. CDK5 ist neben der GSK3 β (Glycogen synthase kinase-3 β) unter anderem für die abnormale Hyperphosphorylierung des Mikrotubuli-Bindungsprotein tau verantwortlich, welche im Gehirn von an der Alzheimer'schen Krankheit leidenden Patienten vorkommt. Es konnte bewiesen werden, dass die Umwandlung von p35 zu p25 die CDK5-Aktivität beeinflusst und für die neuronale Degeneration bei der Alzheimer'schen Krankheit mitverantwortlich ist [Leclerc et al., 2001; Meijer, 1999; Lee et al., 1999]

Die **CDK7** besitzt zwei Funktionen im Zellzyklus. Sie ist im CDK7/Cyclin H-Komplex an der Transkription beteiligt und führt eine aktivierende Phosphorylierung an einer am Zellzyklus beteiligten CDK aus (s. Kap. 2.2.2.1). Bei der Regulation der Transkription ist CDK7/Cyclin H im Zusammenspiel mit einer dritten Untereinheit, MAT1 (Ménage A Trois), Teil eines größeren Komplexes TFIIH (Transcription Initiation Factor IIIH). Dieser phosphoryliert eine Untereinheit der RNS-Polymerase II, welche wiederum im Elongationsablauf benötigt wird. [Yee et al., 1995]

2.2.5 Fehler im CDK-System und ihre pathogenetische Relevanz

Die Komplexität der Regulation des Zellzyklus bietet eine Fülle von Fehlerquellen. Versagen die Kontrollmechanismen der Zelle kann es beim Zusammentreffen mehrerer negativer Faktoren zu einer dauerhaft gestörten Zelle kommen. Die Folge eines dauerhaften Schadens kann im besten Falle sein, dass die veränderte Zelle der Apoptose zugeführt wird und stirbt, im schlechtesten Fall schädigt die mutierte Zelle durch unkontrollierte Vermehrung den

ganzen Organismus. In Krebszellen versagen die Kontrollmechanismen und die Zellen folgen ihrem eigenen Vermehrungsprogramm. Inhibitorische Proteine weisen einen Funktionsverlust auf. In Brustkrebszellen wurde gezeigt, dass die Cycline D und E im Überschuss vorliegen obwohl die inhibitorischen Proteine p15 und p16 die Aktivität von Cyclin D blockieren müssten.

In gesunden Zellen steigt bei einem DNA-Schaden die Konzentration von p53 (Tumorsuppressor, der für den Übergang in die Apoptose verantwortlich ist) an wodurch die Expression von p21 initiiert wird. Dieses bildet dann mit CDK2/Cyclin E bzw. CDK4/Cyclin D einen Komplex und arretiert die Zelle in der G1-Phase. Untersuchungen ergaben, dass bei der Hälfte aller humanen Tumorarten die Funktion des Proteins p53 ausgefallen ist.

In vielen humanen Tumorzellen liegt eine Deregulation oder erhöhte Expression der CDKs sowie eine Überproduktion der Cycline vor. [Sherr 1996] Eine Zusammenstellung der Abnormitäten einiger Zellzyklusgene verschiedener Tumorarten sind in Tabelle 2.4 dargestellt.

Tabelle 2.4: Abnormitäten ausgesuchter Zellzyklusgenen im Menschen

Gen	Abnormität	Erkrankung
Cyclin A	Unnatürliche Stabilisierung	Leberkrebs ^a
Cyclin B	Überexpression Erhöhte CDK1/Cyclin B-Konzentration	Kolonkrebs ^a Alzheimer Erkrankung ^b
Cyclin D	Überexpression / Amplifikation	Brust-, Lungen-, Gehirn-, Darmkrebs ^{a, c}
Cyclin E	Überexpression / Amplifikation	Kolon-, Brust-, Eierstock- Krebs ^{a, d}
CDK1	Überexpression Erhöhte CDK1/Cyclin B-Konzentration	Brust-, Prostata-, Kolon-, Magenkrebs ^a Alzheimer Erkrankung ^b
CDK2	Überexpression	Kolonkrebs ^a
CDK4	Überexpression / Amplifikation	Sarkom, Melanom ^{a, c, d}
CDK5/p35 CDK5/p25	Aufhebung der räumlichen Einschränkung	Parkinson- und Alzheimer- Erkrankung ^{b, e}
cdc25	Überexpression	Brust-, Magen-, Hirn-, Lungenkrebs ^{a, d}
p15	Inaktivierung durch Deletion	Leukämie, Lungenkrebs ^d
p16	Inaktivierung durch Deletion, Punktmutationen, Methylierung	Melanom, Pankreastumor, Lungenkrebs ^a
p21	Verringerte Induktion	Zahlreiche Krebsarten ^{a, c, d}
p53	Mutation, Inaktivierung	Zahlreiche Krebsarten: Kolon, Lunge, Leber, Gehirn

[^a Webster 1998; ^b Meijer et al., 1999; ^c Pavletich 1999; ^d Draetta und Pagano 1996; ^e Mandelkow 1999]

Die Inhibition der Cyclin-abhängigen Kinasen stellt somit einen vielversprechenden Ansatzpunkt zur Behandlung von Krankheiten dar, die durch eine erhöhte Proliferation charakterisiert sind, vor allem zur Behandlung von Krebs. [Meijer et al., 1999, Knockaert et al., 2002]

2.2.6 Weitere niedermolekulare Hemmstoffe von CDKs

Außer Indirubinen (Kap. 2.1.3), gibt es eine Reihe weiterer niedermolekulare CDK-Inhibitoren, die zum Teil als Antitumorwirkstoffe bereits in der klinischen Entwicklung sind. Eine Auswahl der wichtigsten CDK-Inhibitoren sind in Abbildung 2.7 dargestellt.

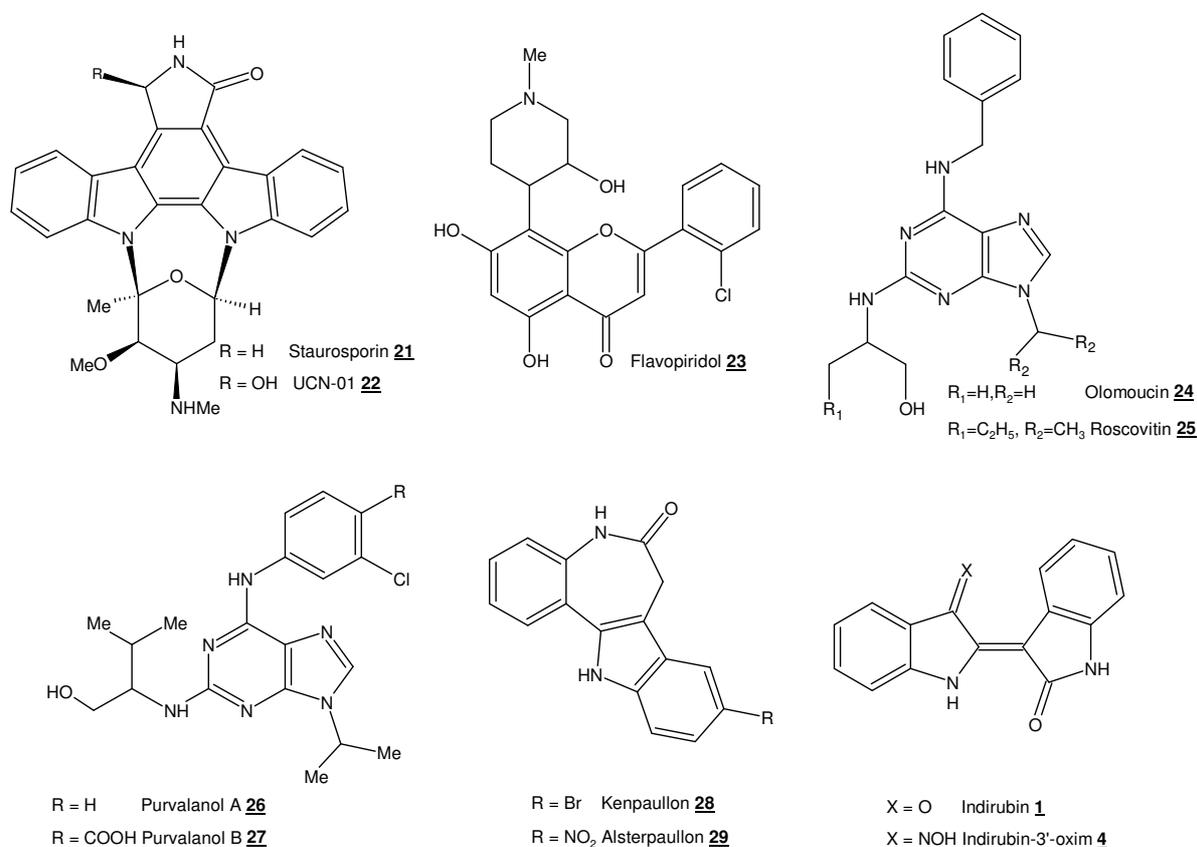


Abbildung 2.8: Niedermolekulare CDK-Inhibitoren

Der Naturstoff **Staurosporin** **21** (Abb. 2.8), ein Indol-Alkaloid, aus *Streptomyces staurosporeus* und anderen Streptomyces-Arten hemmt CDK1/Cyclin B und CDK2/Cyclin A mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich [Gadbois et al., 1992; Rialet und Meijer, 1991]. Staurosporin ist jedoch ein unspezifischer Inhibitor und hemmt zahlreiche andere Proteinkinasen ebenfalls. *In Vivo* zeigt Staurosporin bereits in niedrigen Konzentrationen toxische Effekte [Sausville et al., 2000]. Das Staurosporinderivat **7-Hydroxystaurosporin** **UCN-01** **22** (Abb. 2.8) besitzt eine leicht geringere Aktivität als Staurosporin, zeigt jedoch

eine verbesserte, wenn auch noch sehr geringe Selektivität für CDKs und Proteinkinase C (PKC). Es befindet sich zur Zeit in Phase II der klinischen Prüfung als Antitumor-Wirkstoff in den USA [Senderowicz 2002; Kortmansky et al., 2005].

Flavopiridol 23 ist ein halbsynthetisches Flavon eines natürlich vorkommenden Alkaloids, welches aus der Stammrinde einer indischen Pflanze (*Dysoxylum binectariferum*) gewonnen wird [Sedlacek et al. 1996]. Flavopiridol 23 zeigt keine selektive Hemmwirkung bezüglich der CDK/Cyclin-Komplexe, da es auch andere Kinasen, wie z.B. PKG (cGMP-abhängige Proteinkinase) hemmt. Es wird zur Behandlung von Patienten mit Nieren-, Prostata-, Dickdarm- und Magenkrebs eingesetzt und befindet sich zurzeit in Phase I und II der klinischen Prüfung als Antitumor-Wirkstoff [Senderowicz, 1999; Sedlacek et al., 1996; Drees et al., 1997; Akilu et al., 2003; Liu et al., 2004].

Zu den auf Purin basierenden Verbindungen gehören u.a. **Olomoucine 24** [Vesely et al., 1994], **Roscovitin 25** [Meijer et al., 1997; Meijer und Kim, 1997] und **Purvalanole (z.B. 26 und 27)** [Villerbu et al., 2002]. Olomoucine 24 hemmt mit einem IC₅₀-Wert von 7µM die Komplexe CDK1/Cyclin B, CDK2/ Cyclin E und CDK2/Cyclin A nur mäßig. Die Substanz ist inaktiv gegenüber CDK4/Cyclin D1, PKA und PKG und bewirkt in humanen Fibroblasten einen G1-Arrest [Alesi et al., 1998]. Roscovitin 25 zeigt eine zehnfach höhere CDK-Wirksamkeit als das strukturähnliche Olomoucine 24 und befindet sich zurzeit in Phase I und II der klinischen Prüfung als Antitumor-Wirkstoff [Meijer, 1997; Alesi et al., 1998]. Purvalanol A 26 hemmt sämtliche in Tabelle 2.5 aufgeführten CDK/Cyclin-Komplexe, und besitzt eine hohe Selektivität in Bezug auf die Kinasen PKA, und MAPK sowie GSK3β.

Tabelle 2.5: Kinase-Inhibitor Aktivität ausgewählter Inhibitoren (IC₅₀-Werte in µM) [Buolamwini, 2000; Sielecki, 2000, Meijer, 2000; Meijer, 1996; Senderowicz, 1999]

	Staurosporin <u>21</u>	Flavopiridol <u>23</u>	Olomoucine <u>24</u>	Roscovitin <u>25</u>	Purvalanol A <u>26</u>	Alsterpaullon <u>29</u>
CDK1/Cyclin B	0,003-0,006	0,4	7	0,65	0,004	0,035
CDK2/Cyclin E	0,007	0,17	7	0,7	0,035	0,2
CDK2/Cyclin A	n.b.	0,1	7	0,7	0,07	0,015
CDK4/Cyclin D1	>10000	0,4	>1000	>1000	0,85	>100
CDK5/p35	n.b.	0,17	3	0,16	0,075	0,04
MAPK	0,02	n.b.	30	30	9	>100
PKA	0,008	122-145	230	>1000	9	7
PKG	0,02	6	>2000	>1000	>10	>100

MAPK: mitogen aktivierbare Proteinkinase; PKA: cAMP-abhäng. Proteinkinase; PKG: cGMP-abhäng. Proteinkinase

Paullone (z. B. **28** und **29**) gehören zur Substanzklasse der Benzazepine gehören und zeigen IC_{50} -Werte für die Hemmung von CDK1/Cyclin B im submikromolaren Konzentrationsbereich [Gussio et al., 2000]. Kenpaullon **28** ist jedoch ein potenter zell-permeabler Hemmer der GSK3 β (IC_{50} = 230 nM). Strukturabwandlungen von Kenpaullon **28** führten zu Alsterpaullon **29**, dem Paullon mit der bisher höchsten Aktivität bei CDK1, 2 und CDK5.

2.3 Weitere Targets von Indirubinen

2.3.1 GSK-3 β

Viele Indirubin-Derivate besitzen zusätzlich zu ihrer CDK-Hemmwirkung eine Hemmwirkung auf die Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK-3). Ursprünglich wurde die GSK3 als Regulator des Glykogen-Metabolismus identifiziert [Parker et al., 1983]. In den letzten zwei Jahrzehnten zeigte sich, dass die GSK-3 in einer großen Bandbreite zellulärer Funktionen wie, z.B. den zellulären Metabolismus, Wachstum sowie Differenzierung involviert ist.

Die GSK3 ist eine ubiquitär vorkommende Ser/Thr-Kinase, die aus zwei Isoformen besteht, die über verschiedene Signalwege durch Phosphorylierung an Ser21 (GSK-3 α) oder Ser9 (GSK-3 β), inaktiviert werden kann. Die Inaktivierung ist entscheidend für das Überleben der Zelle, da eine aktive GSK-3 zum programmierten Zelltod (Apoptose) führt [Lucas et al., 2001].

Eine Inaktivierung, der GSK-3 β wird über verschiedene Signalwege vermittelt. Zu den Wichtigsten gehören:

- der Phosphatidylinositol-3-Kinase / Protein Kinase B (PI3K/PKB)-Signalweg, nach Wachstumsfaktor- oder Insulinstimulus

und

- der Wnt Signalweg.

Des Weiteren ist die GSK-3 über die MAPKAP-K1 (MAPK-aktivierte Protein Kinase 1) nach Wachstumsstimulus [Shaw und Cohen, 1999] sowie durch die cAMP-abhängige Protein Kinase A (PKA) [Fang et al., 2000] beeinflussbar.

Die Aktivierung der PKB, durch Insulin über den PI3K/PKB-Signalweg, bewirkt eine Inhibierung der GSK3, was eine Dephosphorylierung und Aktivierung der Glykogen Synthase bewirkt. Es kommt zu einer vermehrten Umwandlung von extrazellulärer Glucose in Glykogen. Die Typ-2-Diabetes mellitus ist charakterisiert durch eine Insulinresistenz was zu

einer nachlassenden Insulinproduktion führt. Der Körper kann Glucose nicht mehr abbauen, sodass mehr Glucose im Blutkreislauf verbleibt und sich der Typ-2-Diabetes manifestiert. Als therapeutische Mittel könnten somit synthetische Verbindungen die die GSK3 hemmen und als Insulinmimetika wirken eingesetzt werden.

Die GSK-3 β besitzt im Wnt Signalweg, einem von mehreren Signalwegen durch die die Zellen auf äußere Signale reagieren können, ebenfalls eine Schlüsselfunktion. Von besonderer Bedeutung ist hierbei der Einfluss von GSK-3 β auf das Protein β -Catenin das durch Bindung an das DNA-bindende Protein TCF/LEF (T-cell factor/Lymphoid-enhancer-binding-factor) als Transkriptionsfaktor Einfluss auf die Genexpression insbesondere von Cyclin D1 besitzt. Ist der Wnt Signalweg nicht aktiviert wird β -Catenin, abhängig von seinem Phosphorylierungsgrad durch Ubiquitinierung und Proteolyse abgebaut. Die Phosphorylierung von β -Catenin geschieht in einem Axin-Multiprotein-Komplex bestehend aus β -Catenin, dem APC-Komplex (adenomatous polyposis coli Protein), GSK-3 und Casein Kinase I (CKI). [Polakis, 2002] CKI und GSK3 phosphorylieren nacheinander β -Catenin und markieren somit β -Catenin für den Ubiquitin-vermittelten Abbau [Amit et al., 2002; Liu et al., 2002]. Ist der Wnt-Signalweg aktiviert so wird der Axin Multiprotein-Komplex destabilisiert und es kommt zu keiner Phosphorylierung von β -Catenin, was zu einer Anreicherung des cytosolischen β -Catenin führt das mit TCF/LEF Einfluss auf die Genexpression (u.a. Cyclin D1-Gen) hat. Eine übermäßige Aktivität des Wnt-Signalweges, die beim Menschen mit verschiedenen Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht wird, sorgt durch GSK-3 β -Hemmung für eine Stabilisierung von β -Catenin und eine vermehrte Zellteilung (Abb. 2.9).

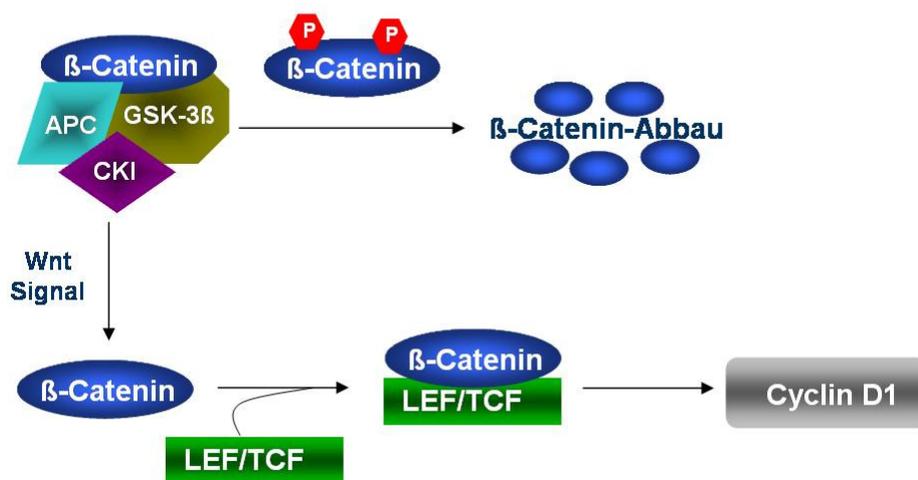


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der Beteiligung von GSK-3 β am Abbau von β -Catenin

In Neuronen ist das tau-Protein das bedeutendste Substrat der GSK-3 β . Es bindet an Zytoskelett-Proteine (Mikrotubuli) und reguliert deren Zusammenbau. In einem durch eine

aktive GSK-3 β verursachten hyperphosphorylierten Zustand kann tau keine Mikrotubuli anlagern [Tsuji et al., 2000] und neigt vermehrt zur Selbstassoziation und bildet gepaarte helikale Filamente (paired helical filaments, PHF), die sich in Neurofibrillenbündel (neurofibrillary tangles, NFT) im Gehirn von Alzheimer Patienten ablagern.

Der Zusammenhang zwischen GSK-3 β und tau-Phosphorylierung konnte z.B. in Neuroblastomen gezeigt werden, indem mittels Wortmannin (PI3K-Inhibitor) die Aktivität der GSK-3 β erhöht wurde, was zur Folge hatte, dass durch die resultierende tau-Phosphorylierung die Apoptose eingeleitet wurde. GSK-3 β sowie CDK5 (vgl. Kap. 2.2.4) sind somit mitverantwortlich für die bei Alzheimer Patienten beobachtete Hyperphosphorylierung des Mikrotubuli-bindenden Proteins tau. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die GSK-3 β ebenfalls in der Entstehung von Amyloid- β -Peptid involviert ist was zu Amyloid Plaques führt die ebenfalls als Ablagerungen im Gehirn von Alzheimer Patienten gefunden wurden. [De Strooper und Woodgett, 2003; Phiel et al., 2003]

Indirubine als ATP-kompetitive Hemmer von Purin/Threonin-Kinasen besitzen ebenfalls eine Hemmung der evolutionär verwandten Kinase GSK-3 β . Für einige Indirubin-Derivate ist eine stärkere Hemmung der GSK-3 β (IC₅₀= 5-50nM) gegenüber der CDK-Hemmung (IC₅₀= 50-100nM) zu beobachten [Leclerc et al., 2001]. Für Indirubin **1** wurde an der GSK-3 β ein IC₅₀ von 0,60 μ M beobachtet, wohingegen an der CDK1 eine um den Faktor 16 schlechtere Hemmung festgestellt wurde (s. Tabelle 2.6).

Tabelle 2.6: Hemmung von CDK1, CDK5 und GSK-3 β durch ausgewählte Indirubin-Derivate [^aLeclerc et al., 2001; ^bThommet 2001; ^cMeijer et al., 2003]

Substanz	GSK-3 β IC ₅₀ [μ M]	CDK1/Cyclin B IC ₅₀ [μ M]	CDK5/p25 IC ₅₀ [μ M]
Indirubin 1 ^{a)}	0,600	10,00	5,50
Indirubin-3'-oxim 4 ^{a)}	0,022	0,18	0,10
5-Methylindirubin 6 ^{a, b)}	0,062	0,28	0,21
Indirubin-5-sulfonsäure 3 ^{a)}	0,28	0,05	0,06
5-Methylindirubin-3'-oxim 8 ^{b)}	0,030	1,50	1,50
6-Bromindirubin 30 ^{c)}	0,045	90,00	53,00
6-Bromindirubin-3'-oxim 31 ^{c)}	0,005	0,32	0,08

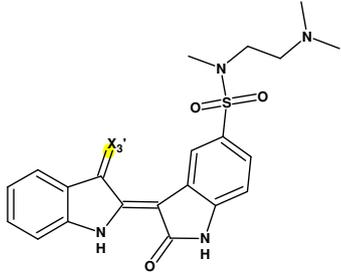
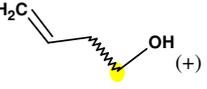
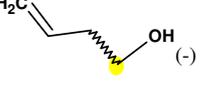
Die Einführung einer Oximfunktion in Position 3' führt auch an der GSK-3 β zu einer Steigerung der Hemmwirkung. So wird für das Indirubin-3'-oxim **4** ein IC₅₀ von 0,022 μ M für die GSK-3 β beobachtet, was eine um den Faktor 10 verbesserte Hemmung im Vergleich

zur CDK1 entspricht. Der Vergleich 5-Methylindirubin-3'-oxim **8** und 5-Methylindirubin **6** zeigt ebenfalls eine deutliche Veränderung der Selektivität der Hemmwirkung.

Bei 6-Bromindirubin **30**, bzw. 6-Bromindirubin-3'-oxim **31** konnte diese Selektivität noch entscheidend verbessert werden. [Meijer et al., 2003]. Einen gegenläufigen Effekt ist bei der Verbindung **3** zu erkennen. Die Indirubin-5-sulfonäure **3** zeigt eine 6 fach stärkere Hemmung der CDK1 als GSK-3 β .

Eine besonders hohe CDK2 Selektivität ist für die erst kürzlich publizierte Verbindung **32** und **33** zu beobachten Tabelle 2.7. Es handelt sich jeweils um ein Racemeren-Gemisch wobei das (+)-Enantiomer **a** aktiver als das (-)-Enantiomer **b** ist. [Jautelat et al., 2005]

Tabelle 2.7: Hemmung der CDK2 und GSK3 [Jautelat et al., 2005]

	Nr	X _{3'}	CDK2 IC ₅₀ [μ M]	GSK3 IC ₅₀ [μ M]
	32a	 OH (+)	0,07	>10
32b	 OH (-)	0,4	>10	
33a	 OH (+)	0,04	>10	
33b	 OH (-)	0,6	>10	

Die GSK-3 β besteht aus einer N-terminalen Domäne (Aminosäure 25-138) aus β -Faltblatt-Strukturen und einer C-terminalen Domäne (Aminosäure 139-343) aus α -Helices, wobei die ATP-Bindungstasche sich zwischen der N- und C-terminalen Domäne befindet [TerHaar et al., 2001; Meijer et al., 2003]. Aus der Röntgenstrukturanalyse der GSK-3 β mit 6-Bromindirubin-3'-oxim **31** (Abb. 2.10) geht hervor dass sich das Indirubin, identisch zu ATP, planar in die hydrophobe Bindungstasche legt und identisch zu der CDK drei Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet [Meijer et al., 2003].

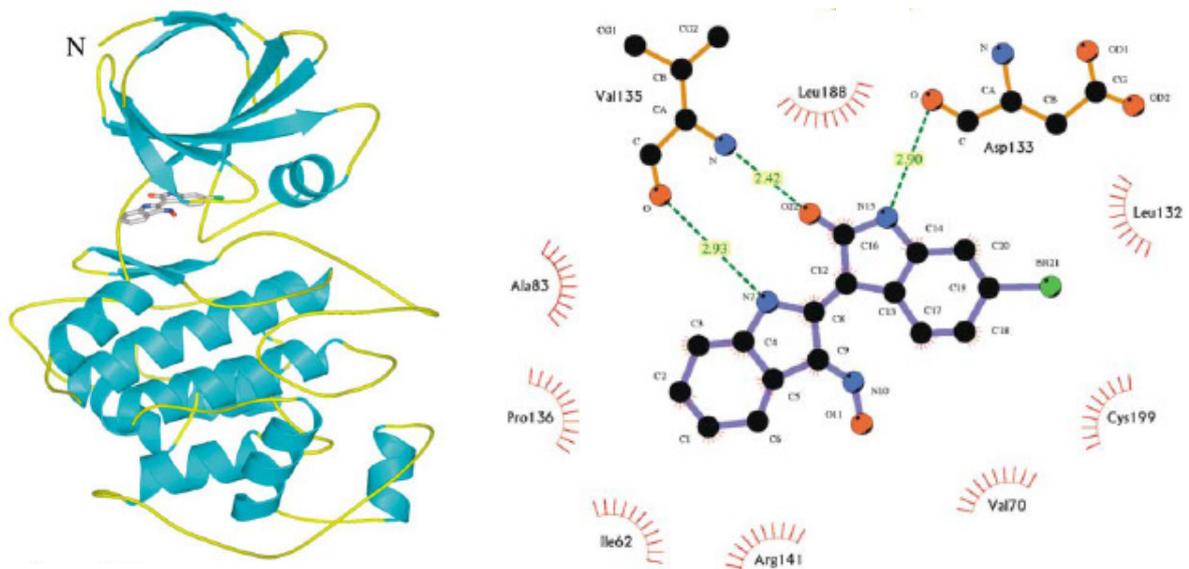


Abbildung 2.10: Links: RSA der GSK-3 β mit 6-Bromindirubin-3'-oxim **31**. Rechts: Schematische Darstellung der Bindungstasche, H-Brückenbindungen sind gestrichelt dargestellt, Van der Waal Kontakte sind als Halbkreise mit Strichen dargestellt. [Meijer et al., 2003]

Sie bilden sich zwischen dem Hauptkettensauerstoff Asp133 mit dem Wasserstoff des Lactam-Stickstoffs N(1), vom Wasserstoff der Amidgruppe des Val135 zum Lactamsauerstoff C(2) des Indirubins und vom Wasserstoff an N(1') zum Sauerstoff von Val135. Auch hier liefern wahrscheinlich die vielen lipophilen Kontakte mit der ATP-Bindungstasche einen Hauptbeitrag zur Indirubin-GSK-3 β -Bindung.

Einer der Hauptunterschiede in der Struktur zwischen den beiden engverwandten Kinasen CDK und GSK-3 β besteht darin, dass in neun von zehn bekannten CDK-Isoformen die Aminosäure Phe80 in die Bindungstasche involviert ist, wohingegen an ihrer Stelle in der GSK-3 β Leu132 vorzufinden ist. In Abbildung 2.11 ist ein schematischer Vergleich der beiden Bindungstaschen von CDK2/Cyclin A und der GSK-3 β anhand der Indirubin-5-sulfonsäure **3** simuliert worden [Fischer 2003].

Aus der Abbildung 2.11 geht hervor, dass die kleine aliphatische Seitenkette L132 bei der GSK-3 (statt F80 bei der CDK) dem Indirubin-Derivat an Position 5 und 6 mehr Platz in der Bindungstasche zur Verfügung stellt.

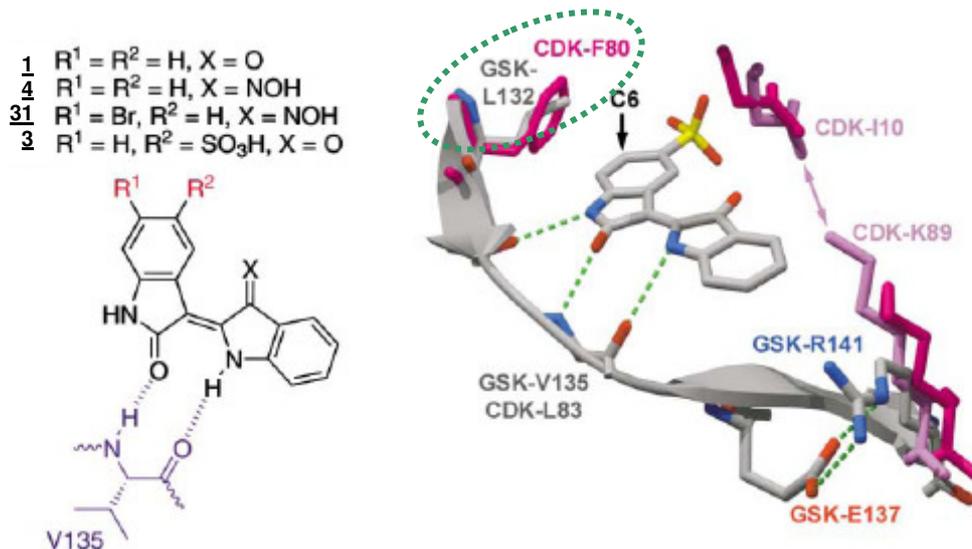


Abbildung 2.11: Vergleich der Bindungstaschen von CDK2/Cyclin A und der GSK-3 β an Hand des Komplex mit Indirubin-5-sulfonsäure **3** [Fischer, 2003]

Somit können Moleküle wie das 6-Bromindirubin-3'-oxim **31** besser in die GSK-3 binden als vergleichsweise in die CDK. Dieser strukturelle Unterschied wird als Hauptursache des Selektivitätsunterschiedes verschiedener Indirubine auf die GSK und CDK diskutiert. [Fischer 2003]

Wie man aus diesen Daten erkennen kann, ist es durch gezielte Synthese möglich Indirubine zu erzeugen die eine Selektivität für GSK-3 β bzw. CDKs besitzen. Somit ist eine spezifische Wirkstoffentwicklung zur Behandlung entweder von neurodegenerativer Erkrankungen (GSK-3 β) oder von Tumorerkrankungen (CDKs) möglich.

2.3.2 STAT3-Hemmung - Nicht-Tyrosin-Rezeptorkinasen

Stat-Proteine sind Signalübertragungsmoleküle und gleichzeitig Transkriptionsfaktoren (Signal Transducer and Activator of Transcription) die eine wichtige Funktion im Zellwachstum, -Differenzierung und Apoptose besitzen. Von den sieben bekannten Stats (Stat1, 2, 3, 4, 5a, 5b und 6) besitzt besonders Stat3 eine wichtige Rolle in der Krebsentstehung. In zahlreichen humanen Tumorzelllinien und Karzinomen (z.B. Lymphome, Melanome, Lungen-, Brust-, Prostata-, Pankreas-Karzinom, CML usw.) konnte nachgewiesen werden dass im Vergleich zu normalen Zellen eine konstitutive Aktivierung von STAT3 vorliegt was zu einer Inhibition von Apoptose und zu unkontrolliertem Zellwachstum beiträgt [Buettner et al., 2002].

STAT3 reagiert auf Rezeptorsignale von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (z.B. VEGF vascular endothelial growth factor).

Bindet an der Zelloberfläche ein Zytokin an seinen spezifischen Rezeptor, dimerisiert dieser und aktiviert rezeptoreigene Tyrosinkinassen, wie z.B. JAKs (Janus Kinase), die den Rezeptor

im Zellinneren phosphorylieren [Ihle, 2001]. Der Tyrosin-phosphorylierte Rezeptor stellt die Bindungsstelle für zytoplasmatisches monomeres STAT Protein dar, das über die SH2 (Src-homology)-Domäne, an den Rezeptor bindet. Phosphorylierung durch z.B. JAK an einem Tyrosin der STAT bildet erneut wieder eine Bindungsstelle für eine SH2-Domäne an dem Rezeptor-gebundenem STAT Protein, das anschließend vom Rezeptor dissoziiert. Die SH2-Domäne zweier abdissoziierten STATs werden reziprok erkannt, wobei die SH2-Domäne eines STAT jeweils das Phosphotyrosin des anderen bindet und ein aktives Dimer bildet. Das entstandene Dimer transloziert in den Kern, bindet an die DNA und wirkt als Transkriptionsfaktor von Zielgenen u.a. wird eine erhöhte Produktion von Apoptosehemmer (Mcl-1, Myeloid Cell Leukemia-1), Zellzyklusregulatoren (Cyclin D1/D2) und Angiogeneseinitiatoren (VEGF, vascular endothelial growth factor) diskutiert (Abb. 2.12). [Buettner et al., 2002]

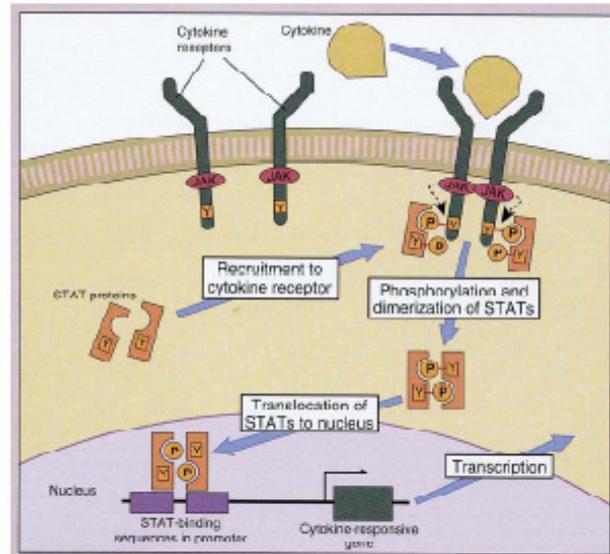


Abbildung 2.12: Jak/Stat Signalweg

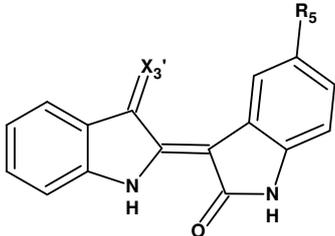
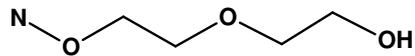
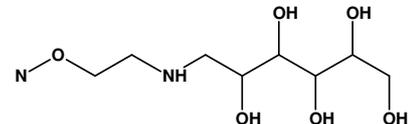
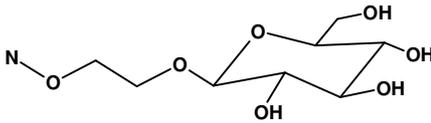
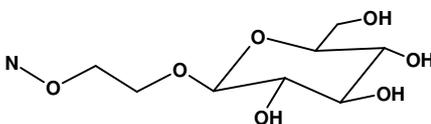
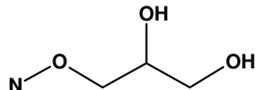
Neben der Phosphorylierung der Rezeptoren durch JAK bei Zytokinrezeptoren können sich Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinaktivität autophosphorylieren [Bowman et al., 2000] und STATs aktivieren sowie kann die Phosphorylierung und Aktivierung der STAT über Nicht-Tyrosin-Rezeptorkinasen wie z.B. die c-Src-Kinase erfolgen. Somit gelten die Tyrosinkinase Jak und c-Src ebenfalls als potenzielle Angriffspunkte in der Krebsbehandlung [Reddy et al., 2000].

Eine erhöhte Proteinexpression von Src-Kinasen als auch eine erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität wird oft in humanen Krebsarten (Colonkarzinom, Brustkrebs, Gehirntumor, Pankreastumor) beobachtet. (Muthuswamy et al., 1994; Moasser et al., 1999; Irby and Yeatman, 2000). Die c-Src-Kinase katalysiert die Phosphorylierung von Tyrosin-Resten von Proteinsubstraten, die eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellproliferation und Differenzierung besitzen. So phosphoryliert und aktiviert c-Src, wie bereits erwähnt, ebenfalls Stat3-Proteine. Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Inhibierung des Src-Stat3-Signals zu einem Wachstumsarrest und Apoptose in humanen Tumorzelllinien führt. (Yu et al., 2004).

Anfangs des Jahres wurde von Nam et al. 2005 erstmals berichtet, dass bestimmte Indirubin-Derivate, neben ihrer CDK und GSK-3 β -Hemmung, ebenfalls eine c-Src-Hemmung besitzen, die wiederum den nachgeschalteten Stat3-Signalübertragungsweg blockiert.

So wurde die Stat3 DNA-Bindungsaktivität der in Tabelle 2.8 aufgelisteten Indirubine mittels EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) u.a. in humanen Brust- und Prostatakrebszelllinien bestimmt. Insbesondere **36** und **38** zeigt eine deutliche Hemmung der Stat3 DNA-Bindung in beiden Zelllinien. Besser wasserlösliche Verbindungen mit Zucker- oder Aminopolyol-Substituenten konnten im Gegensatz dazu keine Hemmung der Stat3 DNA-Bindungsaktivität bewirken.

Tabelle 2.8: Auswahl getesteter Indirubine [Nam et al., 2005]

		
Verbindung Nr	X _{3'}	R ₅
34		H
19		H
35		I
36	N-OH	OMe
37		OMe
38		H

Weitere Untersuchungen wurden mittels **38** aufgrund seiner besseren Wasserlöslichkeit an Brustkrebszellen mit besonders hoher Src-Kinaseaktivität und Stat3 DNA-Bindungsaktivität durchgeführt. Sie belegen, dass E804 die c-Src Kinaseaktivität *in vivo* und *in vitro* blockiert. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass **38** die Tyrosin-phosphorylierung und somit die Aktivierung von Stat3 hemmt, wobei es kein direkter Effekt auf die Stat3 DNA-

Bindungsaktivität *in vitro* zu beobachten war. Dies lies darauf schließen, dass **38** den Stat3-Signalweg in Brustkrebszellen durch Inhibition der up-stream angeordneten c-Src-Kinaseaktivität blockiert.

2.3.3 VEGFR-Hemmung - Tyrosin-Rezeptorkinasen

Tumore sind ab einer gewissen Größe Angiogenese-(Gefäßneubildung)-abhängig. Für ein weiteres Wachstum muss der Tumor zur Versorgung der Zellen ein eigenes Gefäßsystem ausbilden. Normalerweise findet eine Gefäßneubildung bei Erwachsenen nur bei der Wundheilung oder während der Aufbauphase des Endometriums (Schleimhaut an der Innenwand der Gebärmutter) statt [Loos et al., 2005].

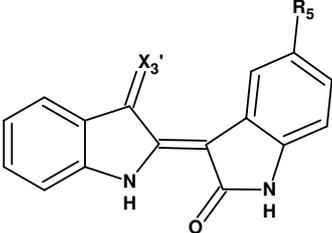
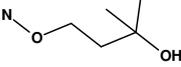
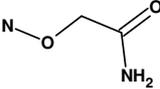
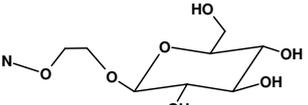
Der wichtigste Angiogenese-stimulierende Faktor ist der Wachstumsfaktor VEGF (vascular endothelial growth factor) der von den meisten soliden Tumoren in großen Mengen exprimiert wird [Berse et al., 1992]. Es bindet an VEGF-Rezeptoren (VEGFR) auf den Endothelzellen bereits bestehender Blutgefäße und aktiviert die VEGF-Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinase. Intrazellulär wird hierdurch eine Signalkaskade in Gang gesetzt wodurch u.a. die extrazelluläre Matrix sich auflöst, die Durchlässigkeit der Kapillaren sich erhöht und Endothelzellen in Richtung Tumor wachsen. Es bilden sich neue Kapillare die den Tumor mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgen [Leung et al., 1989].

Die Inaktivierung des VEGF/VEGFR-Rezeptorsystem hat somit zur Folge dass die Tumolvaskularisierung und das Tumorstadium gehemmt werden. Somit stellt die Hemmung der Angiogenese u.a. ein weitere Behandlungsform für Tumorerkrankungen.

Es zeigte sich, dass Indirubine neben den bereits erwähnten Targets wie CDK, GSK3 und c-Src ebenfalls eine Hemmung der Familie der VEGF-Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinase bewirkt [Devries et al., 1992]. Sie setzt sich aus drei Rezeptoren VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 mit unterschiedlicher Spezifität und Affinität zusammen. VEGFR-1 und VEGFR-2 sind beide Rezeptoren der Gefäßendothelzellen und sind im wesentlichen für die Vermittlung der Effekte von VEGF verantwortlich wohingegen VEGFR-3 auf embryonalen und adulten Lymph-Endothelzellen exprimiert sind und nur bestimmte Isoformen von VEGF binden. [Neufeld et al., 1999]

Wie aus Tabelle 2.9 hervorgeht, besitzen einige Indirubin-Derivate eine gute Hemmung der VEGFR-2 Kinase ($IC_{50} = 50 - 80$ nM) wobei aus dem Vergleich der Hemmung der VEGFR-2 und CDK2/Cyclin E hervorgeht, dass ebenfalls durch geeignete Substitution am Indirubin eine selektive Inhibition der VEGF Rezeptorkinase gegenüber der CDK2 zu erreichen ist. Dies geht besonders aus den Daten der Verbindungen **II** und **IV** hervor (Tab. 2.9). So besitzt Verbindung **II** eine ca. 4fach und Verbindung **IV** eine 50fache verbesserte Hemmung der VEGFR-2 gegenüber CDK2. [Schering AG, 2002]

Tabelle 2.9: Ausgesuchte Indirubin-Derivate und ihre Hemmwirkung an der CDK2/Cyclin E und VEGFR-2 [Schering AG, 2002]

				
Nr	X _{3'}	R ₅	VEGFR-2 IC ₅₀ [nM]	CDK2/Cyclin E IC ₅₀ [nM]
I	N-OH	SMe	80	20
II		H	80	300
III		H	50	150
IV		H	50	2500

Außerdem werden Indirubine auch als Inhibitoren der VEGFR Kinase 3 diskutiert und besitzen neben ihrer Eigenschaft als Angiogenese-Hemmer ebenfalls einen Einfluss auf die Lymphangiogenese. [Schering AG, 2002]

2.4 Fremdstoffmetabolismus

Zahlreiche Stoffe werden im Organismus metabolisiert und somit in ihrer chemischen Struktur verändert. Der von Enzymen katalysierte Stoffwechsel wird auch als Biotransformation bezeichnet und dient der Erhöhung der Polarität von Fremdstoffen um so eine erleichterte Ausscheidung mit Harn und Galle zu ermöglichen. Dies geschieht im Rahmen des Fremdstoffmetabolismus, der in zwei verschiedene Phasen eingeteilt ist.

In der Phase I, der Funktionalisierungsreaktion, werden durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse funktionelle Gruppen in das zu metabolisierende Molekül eingefügt. An diesen Reaktionen sind vor allem Enzyme der Cytochrom P450 (CYP) Isoenzymfamilie beteiligt.

In der Phase II, der Konjugationsreaktion, wird der Metabolit aus der Phase I mit einem polaren Molekül (Glutathion, Glucuronsäure, Sulfat) aus dem Intermediärstoffwechsel der Zelle konjugiert und somit seine Polarität drastisch erhöht.

Der Fremdstoffmetabolismus führt aber nicht immer zu einer Entgiftungsreaktion. Manche Pharmaka werden durch die Metabolisierung erst in ihre aktive Wirkform überführt, man spricht von „metabolischer Aktivierung“. Ist der Metabolit toxischer als die Ausgangssubstanz, so wird dieser Vorgang als „Giftung“ bezeichnet. [Greim und Deml, 1996; Eisenbrand und Metzler, 1994; Marquardt und Schäfer 1994]

2.4.1 Cytochrom-P450-Isoenzyme

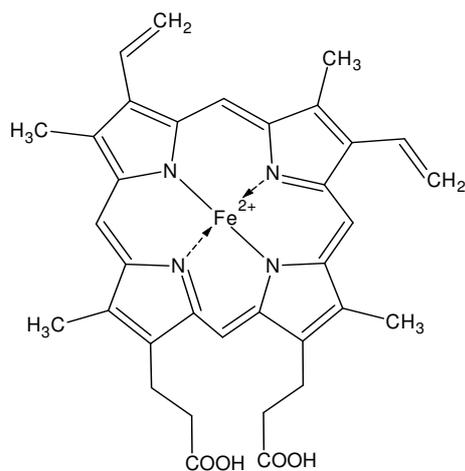


Abbildung 2.13: Struktur von Häm

Cytochrom P450 (CYP) Enzyme sind Häm-haltige Monooxygenasen die ein Häm B als prosthetische Gruppe enthalten. Als Häm B bezeichnet man ein Protoporphyrin IX mit einem komplex gebundenen Eisen-Ion (Abb. 2.13).

Die Stickstoffatome des Protoporphyrinringes besetzen die vier äquatorialen Positionen im oktaedrischen Eisenkomplex, die fünfte axiale Position wird vom Schwefel eines Cysteins aus der Proteinkette eingenommen. Die 6. Koordinationsstelle ist variabel, je nachdem ob Substrate gebunden sind oder nicht.

CYP Enzyme sind die wichtige Enzyme des Phase I Metabolismus und besitzen eine bedeutende Rolle in der oxidativen Biotransformation von Fremdstoffen. Ihre vielfältigen Reaktionsmöglichkeiten mit einem Fremdstoff sind in Abbildung 2.14 am Beispiel des 5-Methylindirubins dargestellt.

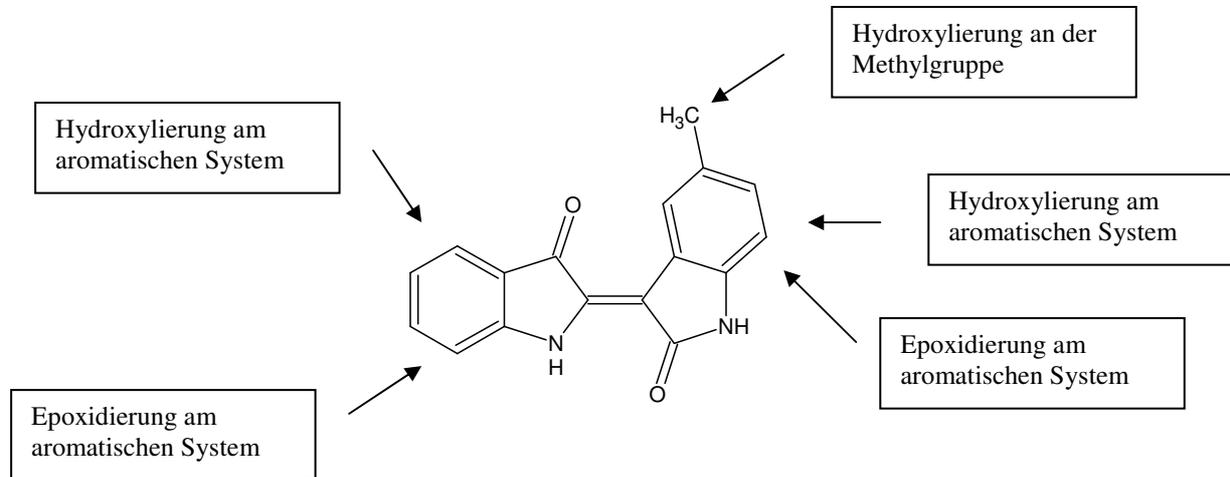


Abbildung 2.14: Cytochrom P450 katalysierte Oxidationen und potentielle Angriffspunkte an 5-Methylindirubin

Cytochrom P450 haltige Monooxygenasen findet man in allen Organen und Geweben, wobei die höchste Aktivität in der Leber, gefunden wird.

Die verschiedenen Isoenzyme der verschiedenen Familien besitzen oft überlappende Spezifität. Der von ihnen katalysierte Schritt ist geschwindigkeitsbestimmend für die Gesamtreaktion, was ihre zentrale Stellung im Fremdstoffmetabolismus unterstreicht.

2.4.2 Nomenklatur

Die Unterteilung der Cytochrom-P450 Enzyme erfolgt nach dem Grad der Gen-Sequenzhomologie. Grundlage ist der Homologiegrad der Aminosäuresequenz (AS-Sequenz), der sich aus der Nucleinsäuresequenz des kodierenden Gens ableitet. [Nebert und McKinnon, 1994; Greim und Deml, 1996]

Die Bezeichnung der CYP-Isoenzyme sei am Beispiel des CYP1A1 erläutert (Abb. 2.15). Die erste Zahl bezeichnet die Enzymfamilie. Ist die AS-Sequenz bei zwei Isoenzymen um mehr als 40 % homolog, gehören sie zur selben Familie. Jede Familie ist zusätzlich in sog. Sub- oder Unterfamilien gegliedert, deren Mitglieder zu mehr als 55 % in der AS-Sequenz identisch sind. Dieses wird mittels des Buchstabens zwischen den Ziffern dargestellt. Das einzelne Isoenzym wird wiederum mit einer Zahl gekennzeichnet. Zwei Isoenzyme gelten als

identisch, wenn ihre AS-Sequenz zu mehr als 97 % identisch sind. [Greim und Deml, 1996, Rendic und Di Carlo, 1997]

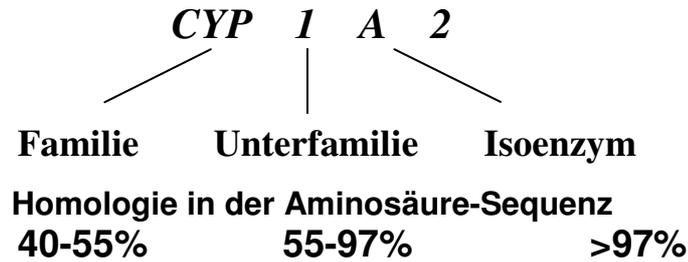


Abbildung 2.15: Nomenklatur der CYP450-Isoenzyme

2.4.3 Mechanismus der Oxidation durch Cytochrom P450

CYP-Enzyme katalysieren insbesondere Oxidationsreaktionen mit molekularem Sauerstoff unter Verbrauch von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH. Dabei wird in einem mehrstufigen Prozess aus einem Sauerstoffmolekül ein Sauerstoffatom auf ein Fremdstoffmolekül übertragen, während das andere Sauerstoffatom durch NADPH zu Wasser reduziert wird. An diesem Prozess ist neben Cytochrom P450 auch eine flavoproteininhaltige Cytochrom-P450-Reduktase beteiligt. Der Mechanismus der Hydroxylierungsreaktion ist in vier Abschnitte unterteilbar:

1. Fremdstoffmolekül bindet an Cytochrom P450

Das Fremdstoffmolekül bindet an einer hydrophoben Stelle in der Nähe der prosthetischen Gruppe. (s. (1) Abb. 2.16)

2. Sauerstoffmolekül bindet an die prosthetische Gruppe

Nachdem das Substrat in der hydrophoben Tasche gebunden ist, wird das zentrale Eisenatom durch NADPH und die Cytochrom-P450-Reduktase von Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert (s. (2) Abb. 2.16). Molekularer Sauerstoff wird mit hoher Affinität an das Fe^{2+} gebunden. (s. (3) Abb. 2.16)

3. Übertragung eines weiteren Elektrons

Durch Aufnahme eines zweiten Elektrons aus NADPH wird ein Sauerstoffatom bis zur zweifach negativen Stufe reduziert (s. (4) Abb. 2.16) und als Wasser abgespalten (s. (5) Abb. 2.16). Dadurch entsteht ein sehr kurzlebiger Eisen-Oxo-Komplex (s. (6) Abb. 2.16) mit hohem Oxidationspotential.

4. Oxidation des Substrats

Man nimmt an, dass die Radikalform des Eisen-Oxo-Komplexes ein H-Atom des Substrates an sich zieht und das gebildete OH-Radikal wieder an das Substratradikal

anlagert (sog. *rebound*-Mechanismus). Daraus resultieren Hydroxyverbindungen (s. (7) Abb. 2.16). Das Sauerstoffatom kann aber aus dem Eisen-Oxo-Komplex auch direkt an eine Position hoher Elektronendichte abgegeben werden. Solche Stellen finden sich beispielsweise bei C=C-Doppelbindungen, aber auch in N- oder S-haltigen organischen Verbindungen. Ist die zu oxidierende Position allerdings durch ein Halogenatom besetzt, wird die Oxidation erheblich erschwert.

Nachdem das Oxidationsprodukt abdissoziiert ist (s. (8) Abb. 2.16), liegt das zentrale Eisenatom wieder im dreiwertigen Zustand vor, die Reaktion kann dann erneut beginnen.

[Greim und Deml, 1996]

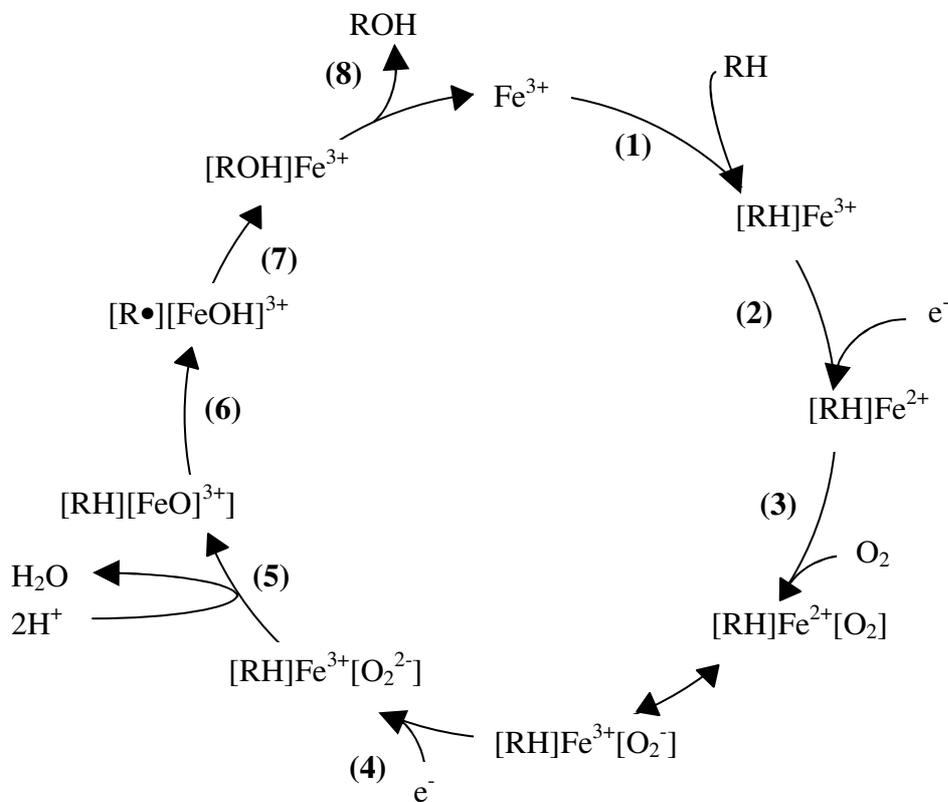


Abbildung 2.16: Reaktionszyklus CYP 450 vermittelter Oxidation

2.5 Synthese

2.5.1 Allgemeine Indirubin-Synthesen

Die erste Synthese von Indirubin-**1R**-Derivaten wurde 1881 von Baeyer beschrieben [Baeyer, 1881]. Er synthetisierte 5-Brom-indirubin, indem er 5-Brom-isatin mit Indoxyl-3-acetat (**42**) in einer methanolischen Lösung mit Natriumcarbonat umsetzte. Die Synthese der Indirubin-Derivate, die in unserem Arbeitskreis angewendet wird, basiert auf der von Russell und Kaupp im Jahre 1969 entwickelten Vorschrift. Hierzu werden substituierte Indoxyl-3-acetate **42R** mit entsprechenden Isatin-Derivaten **43R** kondensiert (s. Abb. 2.17) [Russell und Kaupp, 1969].

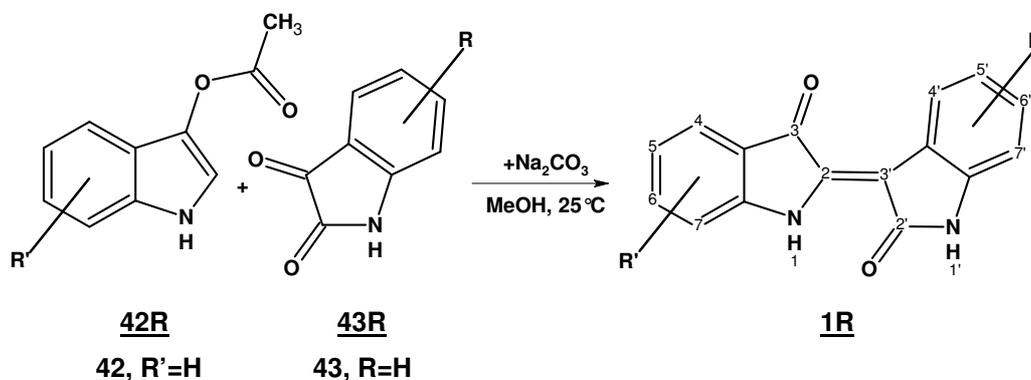


Abbildung 2.17: Herstellung von substituierten Indirubin-Derivaten **1R** ausgehend von substituierten Derivaten des Indoxyl-3-acetats **42R** und des Isatins **43R** [Russell und Kaupp, 1969]

2.5.1.1 Herstellung von Isatinen

Die zur Synthese der Indirubine benötigten Isatine **43** können nach einer Vorschrift von Marvel und Hiers (1941), basierend auf einer von Sandmeyer (1919) entwickelten Methode synthetisiert werden [Sandmeyer, 1919; Marvel und Hiers, 1941]. Für 5-substituierte Isatine werden *para*-substituierte Aniline **44R** mittels Chloralhydrat und Hydroxylaminhydrochlorid zu *N*-(4-Alkylphenyl)-2-hydroxyimino-acetamiden **49** umgesetzt, die anschließend unter Ringschluss und Hydrolyse 5-Alkylisatine **43R** (R= Alkyl) ergeben (s. Abb. 2.18) [Thommet, 2001].

Der Mechanismus lässt sich folgendermaßen beschreiben: Das Anilin **44** reagiert mit Chloralhydrat unter HCl-Abspaltung. Die Carbonyl-Gruppe, die im wässrigen System mit ihrer Hydratform im Gleichgewicht steht (**45**↔**46**), wird anschließend durch einen nucleophilen Angriff von Hydroxylaminhydrochlorid am C-Atom der Carbonyl-Gruppe zum Oxim **48** überführt. Durch Hydrolyse gefolgt von Wasserabspaltung, erhält man das

entsprechende Isonitrosoacetanilid **49**. Durch Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure auf die Oxim-Funktion wird eine elektrophile Spezies **50** generiert, die in der Lage ist, den Benzolring intramolekular an der sterisch günstigsten Stelle unter Bildung eines Fünfringes anzugreifen. Aus dem gebildeten β -Imin **51** entsteht durch Hydrolyse das 5-Alkyl-isatin **43R** (R=Alkyl). [Thommet, 2001]

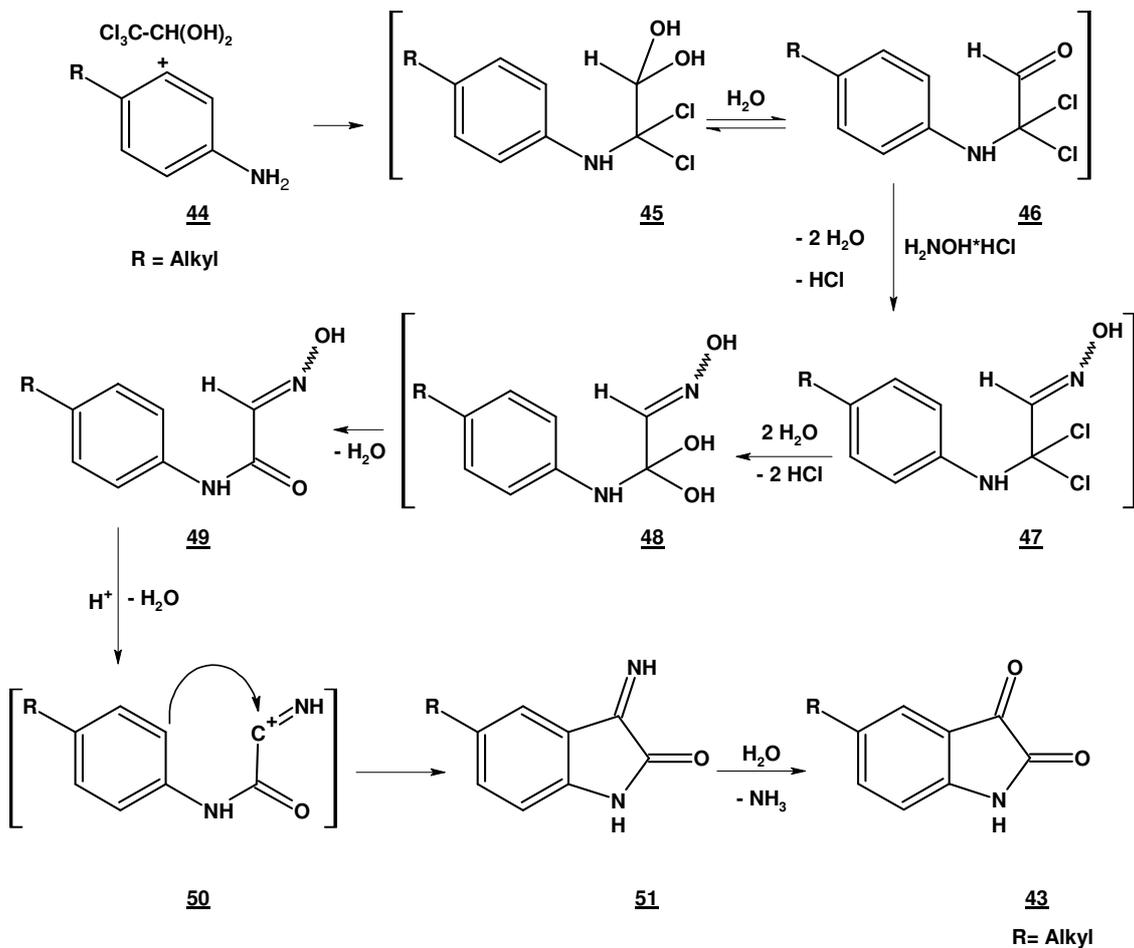


Abbildung 2.18: Synthese von 5-Alkylisatinen aus *para*-substituierten Anilinen

Die beschriebene Methode ist durch den elektrophilen Ringschluss der Spezies **50** für Elektronenakzeptor-substituierte Isonitrosoacetanilide **49** (Erniedrigung der Elektronendichte des Benzolringes) ungeeignet. Jedoch auch Elektronendonator-substituierte Isonitrosoacetanilide **49** können oft auf diesem Syntheseweg nicht hergestellt werden. Oft scheitert die Umsetzung am Einsatz der konzentrierten Schwefelsäure und den hohen Reaktionstemperaturen. Ebenfalls besitzt die Methode für *meta*-substituierte Aniline den Nachteil, dass sie nicht regioselektiv ist und man ein Gemisch aus 4- und 6-substituierten Anilinen erhält [Hewawasam und Meanwell, 1994] und für einige *meta*-substituierte Aniline,

z.B. R = *i*Pr, Ph, OMe, OEt vollkommen versagt [Bramson et al., 2001]. Somit ist die Herstellung von Isatinen nach der Methode von Marvel und Hiers (1941) oftmals ungeeignet. Gassman et al. entwickelte in den Jahren 1974-1977 einen neuen Syntheseweg zur Herstellung von sowohl Elektronenakzeptor-substituierten als auch Elektronendonorsubstituierten Isatin-Derivaten [Gassman et al., 1974; Gassman et al., 1977]. Hierzu wird Ethyl-methylthio-acetat **52** bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit Chlor und Dichlormethan zu einem Chlorosulfid-Komplex **53** umgesetzt, der anschließend unter Abspaltung von HCl mit dem zugesetzten nucleophilen Anilin ein Azasulfoniumsalz **54** bildet (s. Abb. 2.19). Durch Zugabe von Triethylamin und erneuter HCl-Abspaltung entsteht ein Carbanion **55**, das eine Umlagerung vom Sommelet-Hauser-Typ (**55**→**56**) einleitet. Elektronenakzeptor-Substituenten in Position 4 zur Amin-Gruppe begünstigen somit den Angriff. Anschließende Re-Aromatisierung **57** und Zugabe von HCl bewirken den Ringschluss zum substituierten 3-Methylthiooxindol-Derivat **58**, das anschließend unter Ausschluss von Feuchtigkeit mittels Kalium-*tert.*-butanolat und Luftsauerstoff zum Isatin **43** oxidiert [Gassmann et al., 1979].

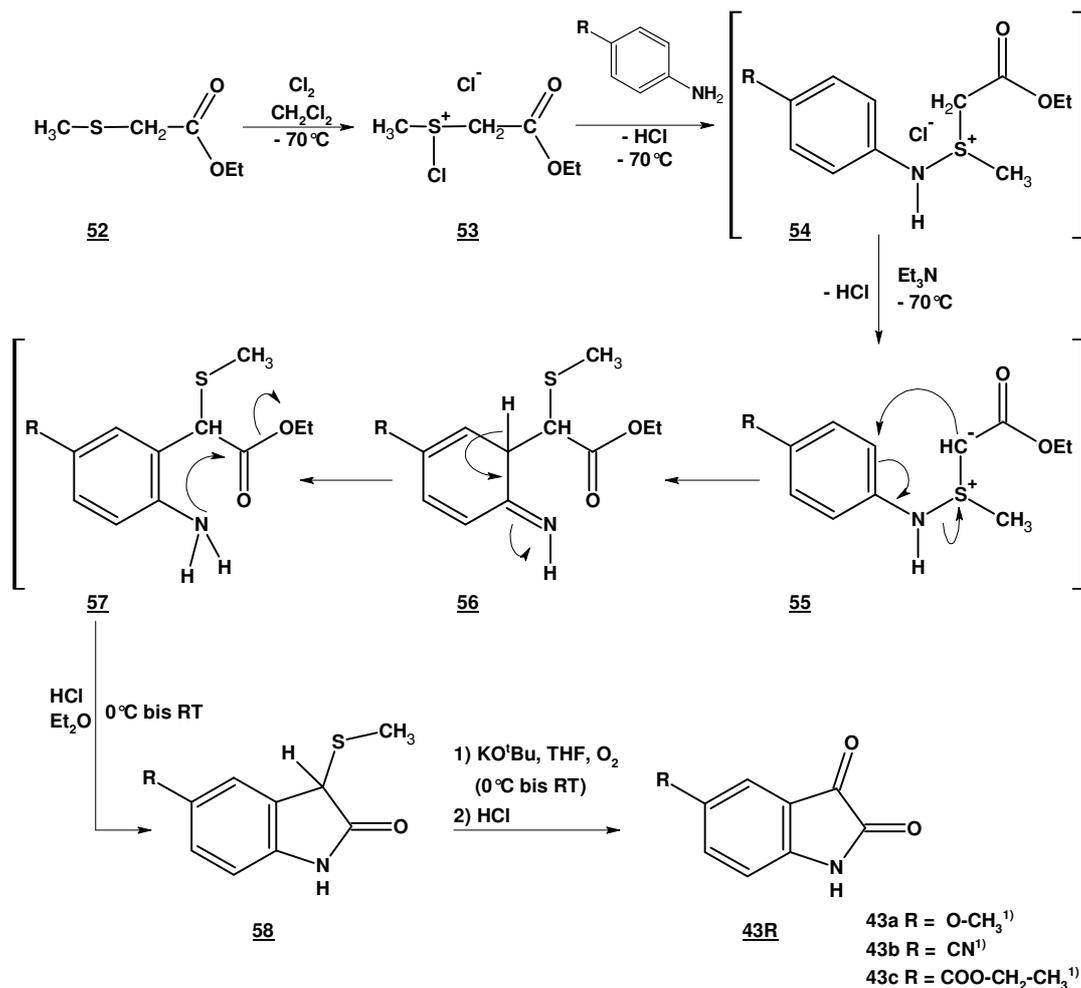


Abbildung 2.19: Herstellung von Isatinen mit Elektronenakzeptor-Substituenten in Position 5 [Gassmann et al., 1974, 1977, 1979][¹⁾ Arbeiten im Arbeitskreis Eisenbrand]

Eine weitere regioselektive Methode zur Herstellung von Isatinen aus Anilinen unabhängig von der elektronischen Natur der Substituenten stellt die von Hewawasam und Meanwell 1994 beschriebene Methode dar. Sie beruht auf der Eigenschaft, dass acylierte Aniline **59** (Abbildung 2.20) einen *ortho*-dirigierenden Effekt (DOM-Effekt; directed ortho metallation) auf eine Metallierung besitzen. [Fuhrer und Geschwend, 1979; Muchowski und Venuti, 1980]. Voraussetzung bei dieser Umsetzung ist, dass die acylierten Aniline **59** kein aktiviertes Wasserstoff-Atom in α -Position zum Carbonyl-C-Atom besitzen an dem die Metallierung ebenfalls stattfinden könnte. Geeignete acylierte Aniline sind N-Pivaloylaniline **60**, [Fuhrer und Geschwend, 1979; Soll et al., 1988] und N-(tert-Butoxycarbonyl)aniline **61** (s. Abb. 2.20) [Muchowski und Venuti, 1980; Reed et al., 1988; MacDonald und Poindexter, 1987; Stanetty et al., 1992; Alvarez et al., 1992].

Bei der Umsetzung entsteht mittels Butyllithium (BuLi) ein Di-Anion **62** über das mittels Diethyloxalat, eine α -Ketoester-Hälfte in *ortho*-Position zur geschützten Amino-Gruppe des Anilins eingeführt wird **63**. Anschließend Entfernung der Amino-Schutzgruppe mit gleichzeitigem Ringschluss führt zum gewünschten Isatin-Derivat **43R** (s. Abbildung 2.20). [Hewawasam und Meanwell, 1994]

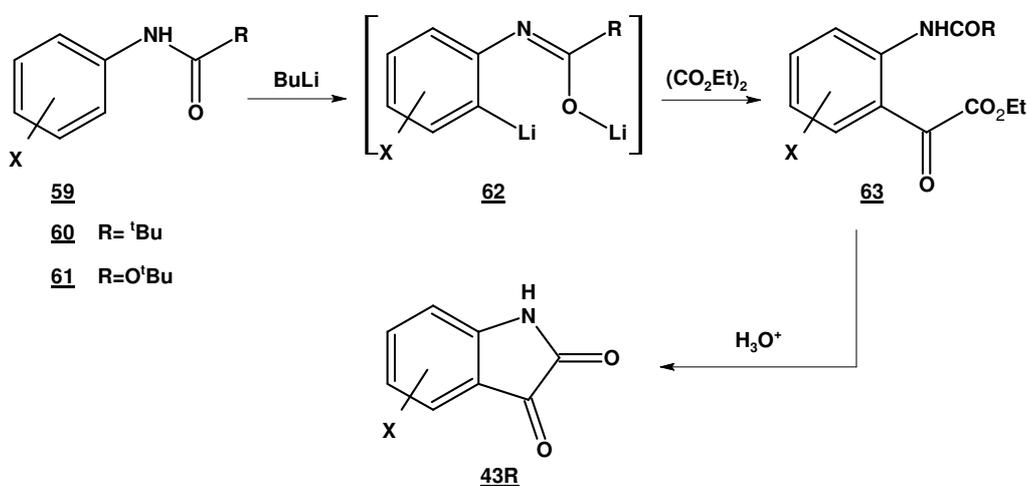


Abbildung 2.20: Darstellung von regio-spezifischen, funktionalisierten Isatinen aus Anilinen [Hewawasam und Meanwell, 1994]

Isatin-5-sulfonamide **43d** (R= SO₂NR₂) werden nach einer Vorschrift von Haller 1938 durch Sulfonierung von Isatin **43** mit Chlorsulfonsäure über 3,3-Dichloroxindol-5-sulfonylchlorid **64** und anschließender Umsetzung mit einem entsprechenden Amin dargestellt (Abbildung 2.21). Die beiden Chloratome in Position 3 der Verbindung **64** werden durch Verkochen mit Wasser wieder in die Carbonyl-Gruppe überführt (Abb. 2.21). [Haller, 1938 a + b; Hössel 1999b]

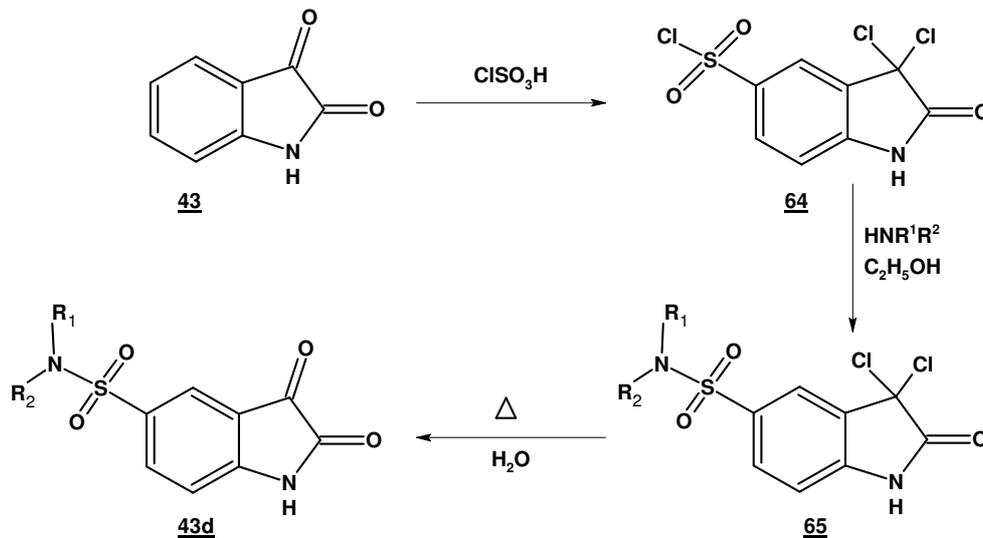


Abbildung 2.21: Synthese von Isatin-5-sulfonamide **43d** aus Isatin **43** [Hössel, 1999b]

2.5.1.2 Herstellung von Indoxyl-3-acetat-Derivaten

Substituierte Indoxyl-3-acetat-Verbindungen **42R** sind durch Ringschluss substituiertes *N*-Phenyl-glycin-*o*-carbonsäuren **66R** zugänglich. Hierzu wird die substituierte *N*-Phenyl-glycin-*o*-carbonsäure **66R** durch Erhitzen in Essigsäureanhydrid in Gegenwart von Natriumacetat zu Diacetylindoxyl **67R** umgesetzt und anschließend mittels Hydrolyse in das freie Indoxyl überführt. Kontrollierte Acetylierung führt schlussendlich in das gewünschte Indoxyl-3-acetat **42R** (s. Abb. 2.22). [Holt und Sadler, 1958]

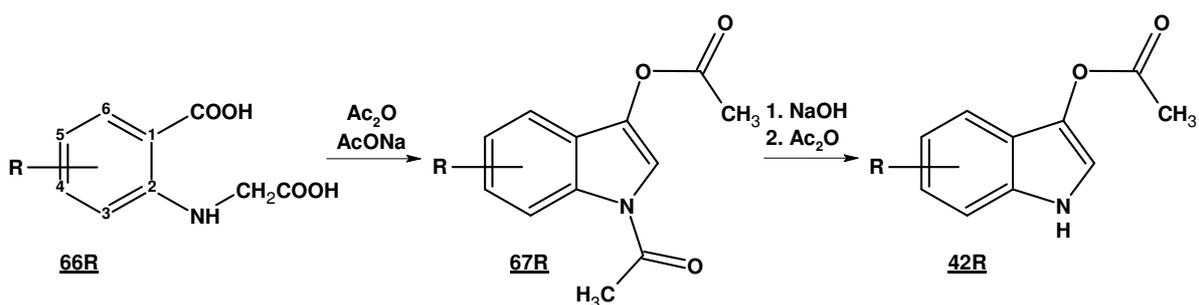


Abbildung 2.22: Herstellung von substituierten Indoxyl-3-acetat-Verbindungen **42R** aus *N*-Phenyl-glycin-*o*-carbonsäuren **66R** [Holt und Sadler, 1958]

Die Herstellung der substituierten *N*-Phenyl-glycin-*o*-carbonsäuren **66R** erfolgt je nach Substitutionsmuster nach unterschiedlichen Synthesewegen:

Eine Substitution in Position 5, oder 5 und 3 ist durch direkte Substitution des Phenylringes von *N*-Phenyl-glycin-*o*-carbonsäure **66** (R=H) (s. Abb. 2.23, *Weg a*) oder durch Reaktion von substituiertes Anthranilsäure **68** mit Chloressigsäure erreichbar (s. Abb. 2.23, *Weg b*) [Holt und Sadler, 1958].

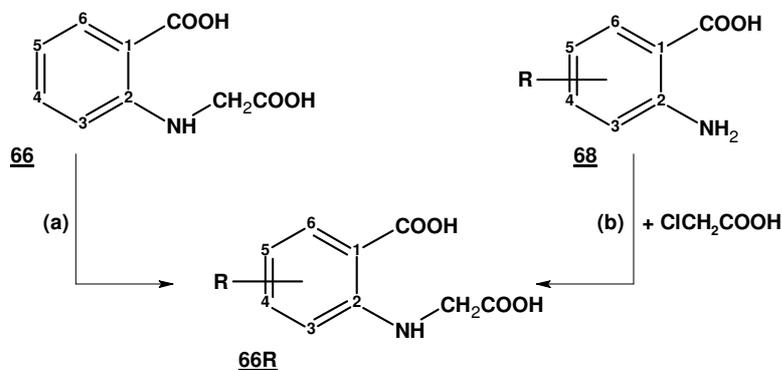


Abbildung 2.23: Herstellung von in Position 5 oder 5 und 3 substituierten *N*-Phenyl-glycin-*o*-carbonsäuren **61R** [Holt und Sadler, 1958]

Ist die Anthranilsäure **68** bereits in Position 3 substituiert, führt die in Abbildung 2.23 beschriebene Kondensation mit Chloressigsäure (*Weg b*) nicht zu der *N*-Phenyl-glycin-*o*-carbonsäure **66R**. Die Substitution der in Position 3 substituierten *N*-Phenyl-glycin-*o*-carbonsäuren **66R** erreicht man über den Umweg *e, f, g* aus Abbildung 2.24, indem die Anthranilsäure **68** zuerst in ein Formalid **69** (*Schritt e*) und anschließend in ein Nitril **70** überführt wird (*Schritt f*). Umsetzung des Nitrils **70** mit NaOH ergibt die entsprechende *N*-Phenyl-glycin-*o*-carbonsäure **66R** (*Schritt g*). [Holt und Sadler, 1958]

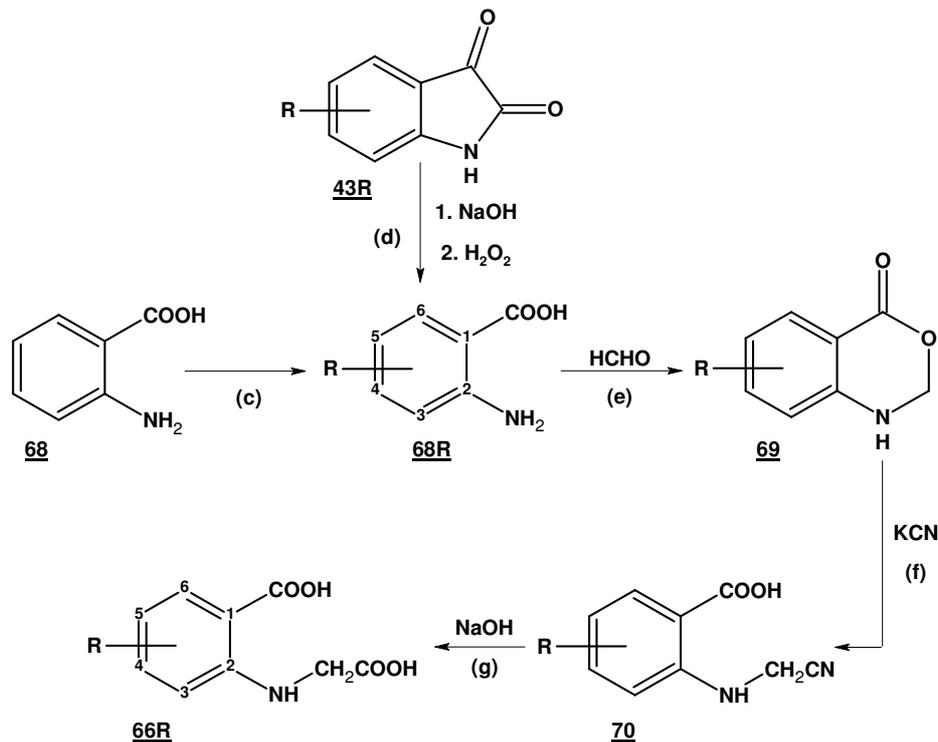


Abbildung 2.24: Herstellung von in Position 3 oder 4 oder 6 substituierten *N*-Phenyl-glycin-*o*-carbonsäuren **66R**, [Holt und Sadler, 1958]

Substituierte Anthranilsäure **68R** wird entweder durch direkte Substitution (Position 5 oder 3 und 5) (s. Abb. 2.24, *Weg c*) oder durch Oxidation von substituierten Isatinen **43R** mittels Wasserstoffperoxid in Gegenwart von NaOH (Position 4 und 6) erzeugt (siehe Abbildung 2.24, *Weg d*). Die benötigten 4- und 6-substituierten Isatine **43R** werden wie in Kap. 2.5.1.1 nach Marvel und Hiers aus *meta*-substituierten Anilinen hergestellt. Der Ringschluss des dabei entstehenden Isonitrosoacetanilids ergibt ein Isomerengemisch aus 4- und 6-substituiertem Isatin, das anschließend getrennt werden muss. [Holt und Sadler, 1958]

2.5.2 Herstellung von Indirubin-3'-oxim-Derivaten und Indirubin-3'-oximethern

Die Synthese der Indirubin-3'-oxime ist auf ein Patent der Farbwerke Hoechst (1913) zurückzuführen. Durch Erhitzen von Indirubinen **1R** mit Hydroxylaminhydrochlorid in Pyridin entstehen Indirubin-3'-oxim-Derivaten **71R** (Abb. 2.25).

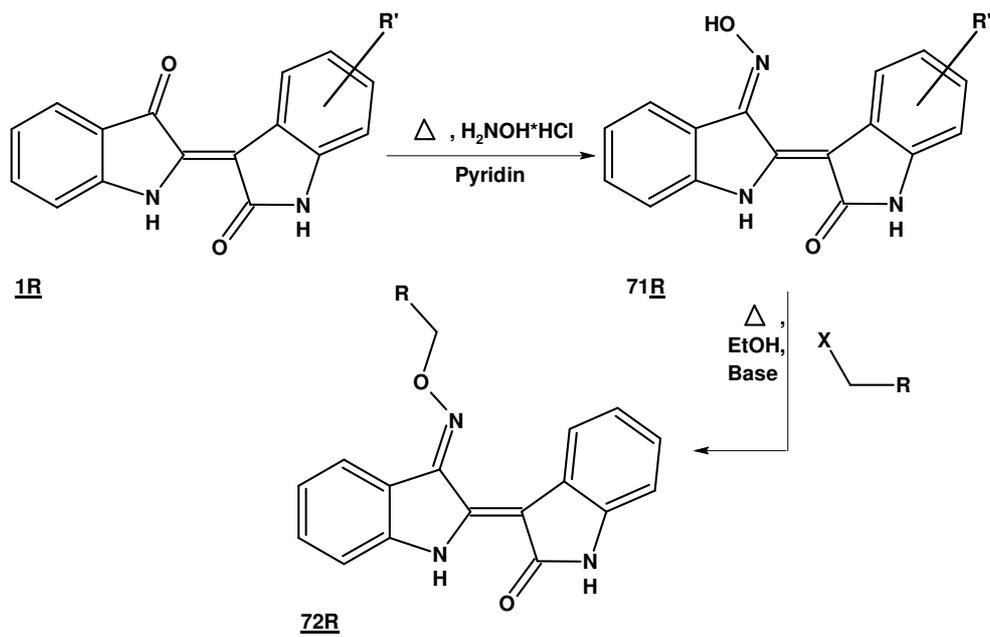


Abbildung 2.25: Synthese von Indirubin-3'-oximen **71R** und Indirubin-3'-oximethern **72R** [Thommet, 2001; Schwahn 2004]

Indirubin-3'-oximether **72R** (Abb. 2.25) wurden in unserem Arbeitskreis etabliert. Durch Umsetzung von Indirubin-3'-oxim **71R** mit funktionalisierten Halogenalkanen gelang die Synthese entsprechender Indirubin-3'-oximether [Hössel, 1999b; Thommet, 2001]. Glycosidische Indirubin-3'-oximether wurden nach gleicher Methode mit Halogenalkylglycosiden in Ethanol und Tetramethylguanidin als Base synthetisiert [Schwahn, 2004]

3 Problemstellung

5-Methylindirubin **6** ist ein potenter CDK-Hemmer, der am isolierten CDK-Komplex CDK1/Cyclin B und CDK2/Cyclin E eine Hemmung im mikromolaren Bereich aufweist ($IC_{50} = 0,3\mu M$ bzw. $IC_{50} = 3\mu M$). *In vitro* konnte für 5-Methylindirubin im Sulforhodamin B-Assay sowie im Colony-Forming Assay ($IC_{70} = 27\mu M$) an verschiedenen Tumorzelllinien eine Wachstumshemmung festgestellt werden, die auch in einer ersten durchgeführten *in vivo*-Untersuchung belegt wurde. 5-Methylindirubin **6** konnte als einzige der getesteten Verbindungen an athymen Nacktmäusen mit subkutan implantiertem Tumoxenograft des grosszelligen Lungenkarzinoms LXFL529 einen Stillstand des Tumorwachstums bewirken.

Als weiterführende Untersuchung zum *in vivo* Versuch soll in dieser Arbeit der *in vitro* Metabolismus ausgewählter Indirubine untersucht werden, um Aufschluss darüber zu erhalten, ob ein möglicher Metabolit eine Aktivierung oder Deaktivierung der Ausgangsverbindung darstellt und somit die oft beobachtete Differenz zwischen der Hemmwirkung an der lebenden Zelle und dem isoliertem Enzym erklärt.

Am Beispiel von 5-Methylindirubin **6** (Abb. 3.1) sollen nach mikrosomaler Umsetzung mögliche Metaboliten isoliert und identifiziert werden. 5-Methylindirubin **6** soll hierfür mit einer Reihe von tierischen Lebermikrosomen inkubiert werden. Die entstehenden Metaboliten sollen mittels einer eigens entwickelten LC/MS-Methode isoliert und massenspektroskopisch charakterisiert werden. Darüberhinaus soll der Metabolismus ausgewählter Indirubin-Derivate (Abb. 3.1) bei Inkubation mit Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen bestimmt werden.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit sollen die charakterisierten Hauptmetaboliten von 5-Methylindirubin **6** synthetisiert und auf ihre Hemmwirkung an verschiedenen Tumorzelllinien getestet werden. Dies soll Aufschluss darüber geben, ob die Aktivität der Ausgangsverbindung metabolisch moduliert wird und somit eine Erklärung für die beobachtete Diskrepanz zwischen der Hemmung am isolierten Enzym und der Tumorzelllinie geben.

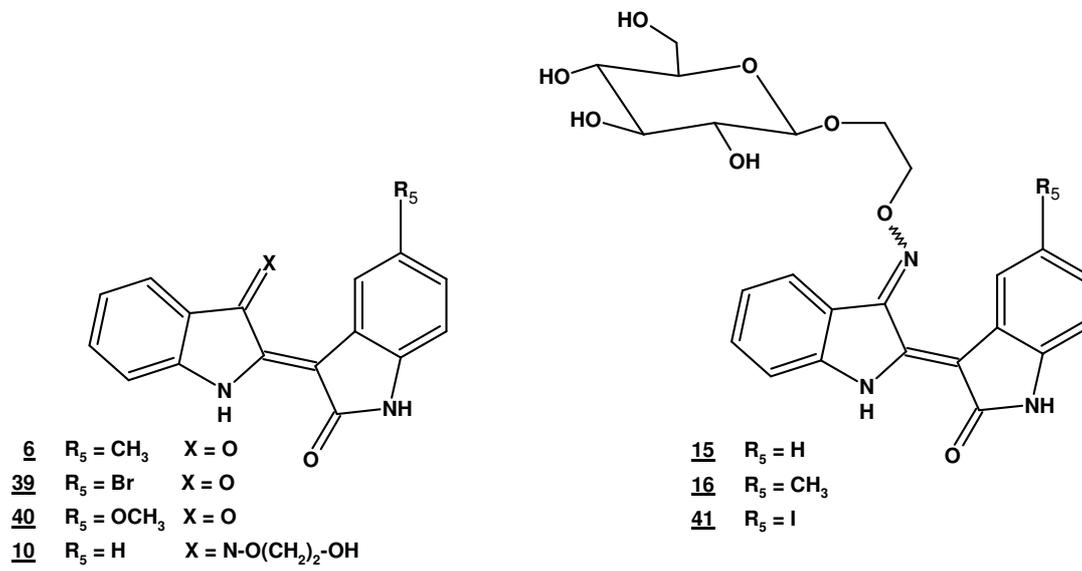


Abbildung 3.1: Strukturformeln der getesteten Indirubin-Derivate

4 Eigene Ergebnisse und Diskussion

4.1 Analytik

4.1.1 Untersuchungen zum oxidativen in-vitro-Metabolismus von 5-Methylindirubin (6)

4.1.1.1 Methodik

4.1.1.1.1 Vorgehen

Zur Bestimmung von Phase-I-Metaboliten werden ausgewählte Indirubine mit Lebermikrosomen inkubiert. Lebermikrosomen besitzen eine hohe Aktivität an Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenase, die im Organismus ubiquitär vorkommen und für welche die meisten lipophilen Fremdstoffe Substrate darstellen.

Die Präparation der Mikrosomen aus Lebergewebe von Rind, Schwein sowie unbehandelten und Aroclor-induzierten männlichen Wistar-Ratten erfolgt nach dem Prinzip einer fraktionierten Zentrifugation (s. Kap. 6.3.3). Die erhaltenen Lebermikrosomen werden anschließend bezüglich ihres Proteingehaltes und ihres Gesamtgehaltes an CYP450 charakterisiert. Der CYP450 Gesamtgehalt erfasst die Summe aller Isoenzyme der CYP450 Superfamilie. Die Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen weisen erwartungsgemäß die höchsten Cytochrom P 450-Gehalte auf (s. Tab. 4.1.1).

Tabelle 4.1.1 : Charakterisierung der tierischen Lebermikrosomen

Species	Proteingehalt [mg/ml Suspension]	Cytochrom P450 [nmol/mg Protein]
Rind	54,0	0,86
Schwein	36,1	0,84
Ratte uninduziert	12,3	0,47
Ratte Aroclor-induziert I	27,0	1,78
Ratte Aroclor-induziert II	25,0	0,98
Ratte Aroclor-induziert III	16,1	1,09

Die Standardinkubation der mikrosomalen Umsetzung erfolgt nach dem in Abbildung 4.1.1 abgebildeten Schema. Hierzu wird das entsprechende Indirubin mit den Lebermikrosomen in einer Puffer-Lösung vorgelegt (Reaktionsmischung) und für 5 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe des NADPH generierendem System (Metabolismus-System) wird die Inkubation für eine definierte Zeit im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird

anschließend mit eisgekühltem Aceton gestoppt und die Analyten mit Ethylacetat extrahiert. Dabei soll eine Zentrifugation der Extraktlösung verhindern, dass Schwebeteilchen extrahiert werden. Die organische Phase wird anschließend zum Trocknen im Stickstoffstrom eingengt, der Rückstand in Methanol aufgenommen und der HPLC-MS/MS-Analyse zugeführt. Eine Blindprobe (durch Erhitzen inaktivierter Mikrosomen) wird parallel mitgeführt.

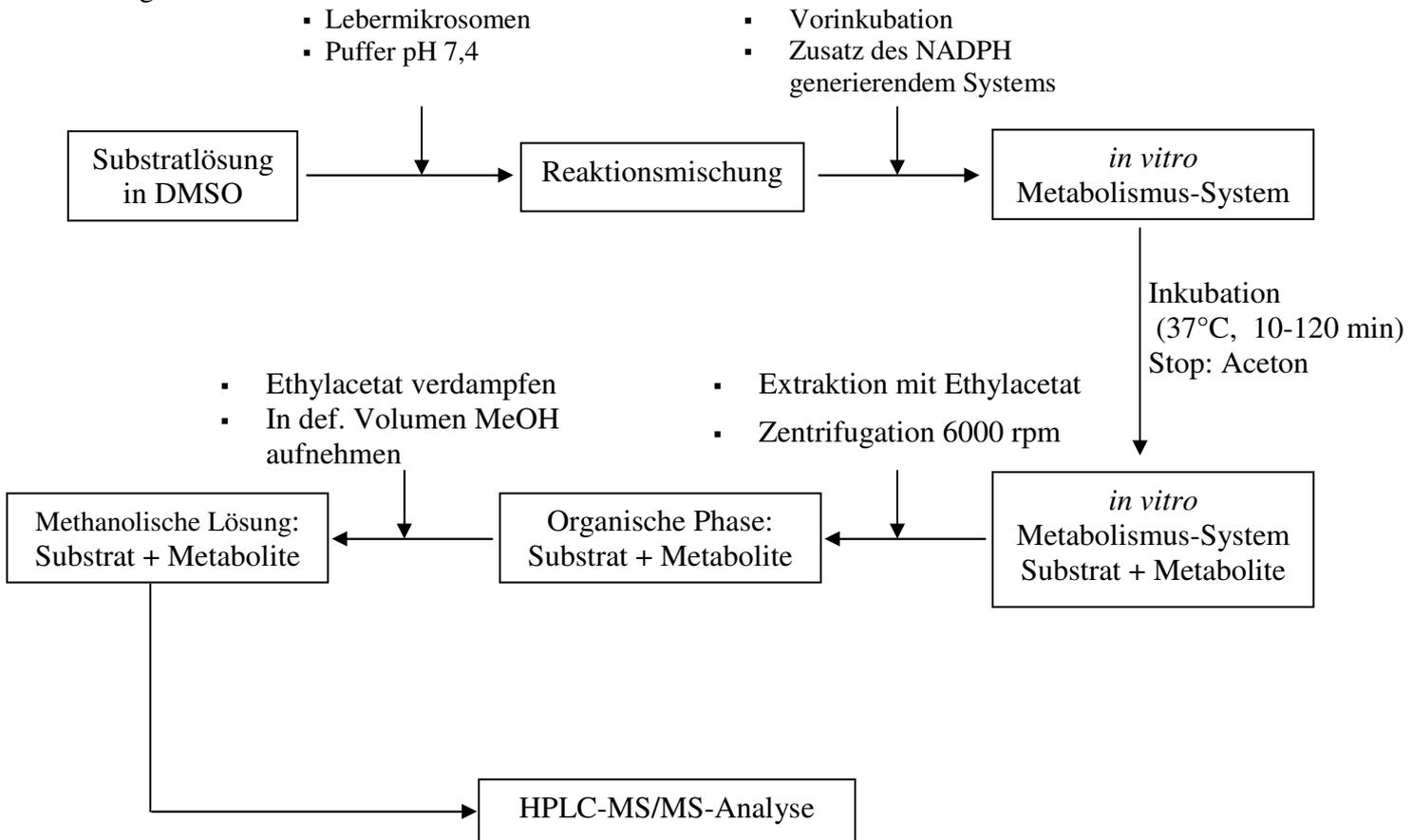


Abbildung 4.1.1: Mikrosomale Standardumsetzung

4.1.1.1.2 LC-MS-Methodenentwicklung zur Trennung und Charakterisierung der Metaboliten

4.1.1.1.2.1 HPLC-Trennung

Zur Trennung der durch die Inkubation mit Lebermikrosomen entstandenen Metaboliten wird ein HPLC-Programm mittels Umkehrphase (RP)-HPLC entwickelt. Als Trennsäule wird eine RP-18 endcapped-Säule verwendet, wobei die Flussrate 1 ml/min beträgt und die Detektion mit einem UV-Detektor erfolgte. Das optimierte Wasser/Methanol-Gradientenprogramm sowie das UV-Chromatogramm der HPLC-Trennung von 5-Methylindirubin 6 nach Inkubation mit Rinderlebermikrosomen ist in Abbildung 4.1.2 dargestellt (Inkubationsbedingungen s. Kap. 6.4.1).

Die Elution der Ausgangsverbindung 5-Methylindirubin **6** (größter Peak) erfolgt bei 16,7 Minuten, was aus dem Chromatogramm der gleichzeitig mit hitzedeaktivierten Mikrosomen durchgeführten Inkubation hervorgeht (Abb. 4.1.3). Die bei früheren Retentionszeiten detektierten Peaks entsprechen den durch die Inkubation entstandenen Metaboliten.

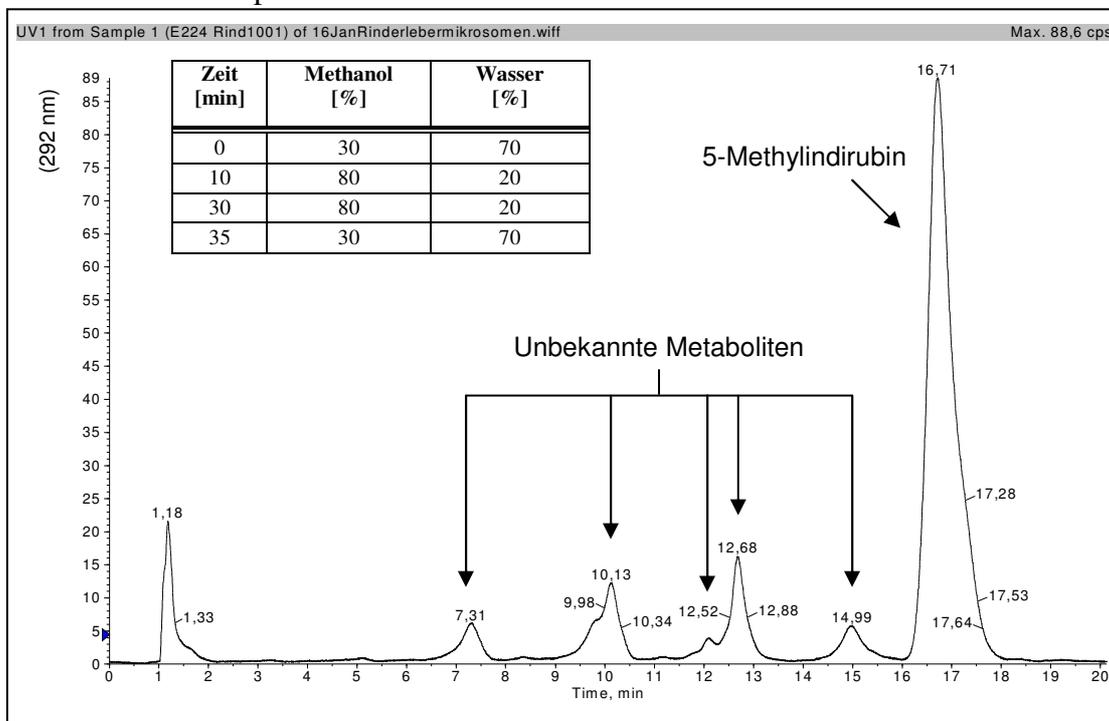


Abbildung 4.1.2: UV-Chromatogramm: Inkubation von Rinderlebermikrosomen mit 5-Methylindirubin **6**; Purospher RP-18e (5 μ m), LiChroCART 125-4, UV-Detektion bei 292 nm

4.1.1.1.2.2 Optimierung der MS-Bedingungen

Nachdem die HPLC-Trennung etabliert ist, müssen anschließend die Bedingungen zur Detektion der Analytsubstanzen und Metaboliten im Massenspektrometer optimiert werden. Hierzu wird eine Fließinjektionsanalyse (FIA) durchgeführt, bei der es sich um einen LC-MS-Lauf ohne Säule mit einer konstanten Fließmittelzusammensetzung handelt. Hierzu wird die mittlere Fließmittelzusammensetzung (50% Methanol, 50% Wasser) verwendet, so dass die Bedingungen ähnlich dem später verwendeten Fließmittelgradienten sind (s. Kap. 6.5.2). Zur Erzeugung einer besseren Ionisierung der untersuchten Verbindungen, wird Wasser durch eine 10 mM Ammoniumacetat-Lösung ersetzt. Dieser Elektrolytzusatz bewirkt eine indirekte Ionisation, die durch Protonierung, Kationenanlagerung, Deprotonierung, Anionenlagerung oder Reaktion von Elektrolytionen mit Molekülen in der Gasphase erreicht wird. Ammoniumacetat besitzt weiterhin den Vorteil, dass es rückstandslos verdampfbar ist [Schmelzeisen-Redeke, 1989]. Durch wiederholte Injektionen der Probelösung durch den Autosampler, werden die verschiedenen Parameter vom System semi-automatisch variiert, wobei gleichzeitig die Einstellungen, die von der Fließmittelzusammensetzung und der

Flussrate abhängig sind, optimiert werden. Die ermittelten MS-Parameter sind in Kapitel 6.5.2 aufgeführt.

4.1.1.2 *Metaboliten von 5-Methylindirubin (6)*

5-Methylindirubin **6** bewirkte in einem *in vivo*-Versuch (s. Kap. 2.1.6) einen Stillstand des Tumorwachstums [Hössel 1999b]. Um zu prüfen, ob dieser Effekt auf einen entstandenen Metaboliten zurückzuführen ist, soll hier der *in vitro* Metabolismus untersucht werden. Deshalb wird im folgendem der Metabolismus von 5-Methylindirubin **6** in verschiedenen tierischen Lebermikrosomen untersucht. Gleichzeitig soll ermittelt werden ob ein Speziesunterschied im Metabolitenspektrum vorliegt.

4.1.1.2.1 **Inkubation mit Rinderlebermikrosomen**

Die Inkubationsansätze in Rinderlebermikrosomen wurden mit einem Proteingehalt von 1 mg/ml durchgeführt.

Die Analyse der Inkubation erfolgt mit den zuvor ermittelten Parametern für die chromatographische Trennung mittels RP-HPLC sowie Detektion mittels Massenspektrometer. Beide Geräte sind miteinander gekoppelt und ergeben zu jedem Zeitpunkt der chromatographischen Trennung das zugehörige Massenspektrum.

Im UV-Chromatogramm in Abbildung 4.1.3 erkennt man bei einer Retentionszeit von 16,7 Minuten (intensivster Peak) die nichtmetabolisierte Ausgangsverbindung 5-Methylindirubin **6**. Im Vergleich zu dem UV-Chromatogramm der Kontrollinkubation treten zusätzlich zu 5-Methylindirubin fünf weitere Peaks bei kleineren Retentionszeiten auf. Sie sind Metaboliten zuzuordnen, die durch die Mikrosomeninkubation entstanden sind. Da es sich bei dem Trennsystem um ein RP-(reversed Phase)-System handelt, müssen die entstandenen Metaboliten aufgrund ihrer kürzeren Retentionszeiten im Vergleich zu der Ausgangsverbindung polarer als diese sein.

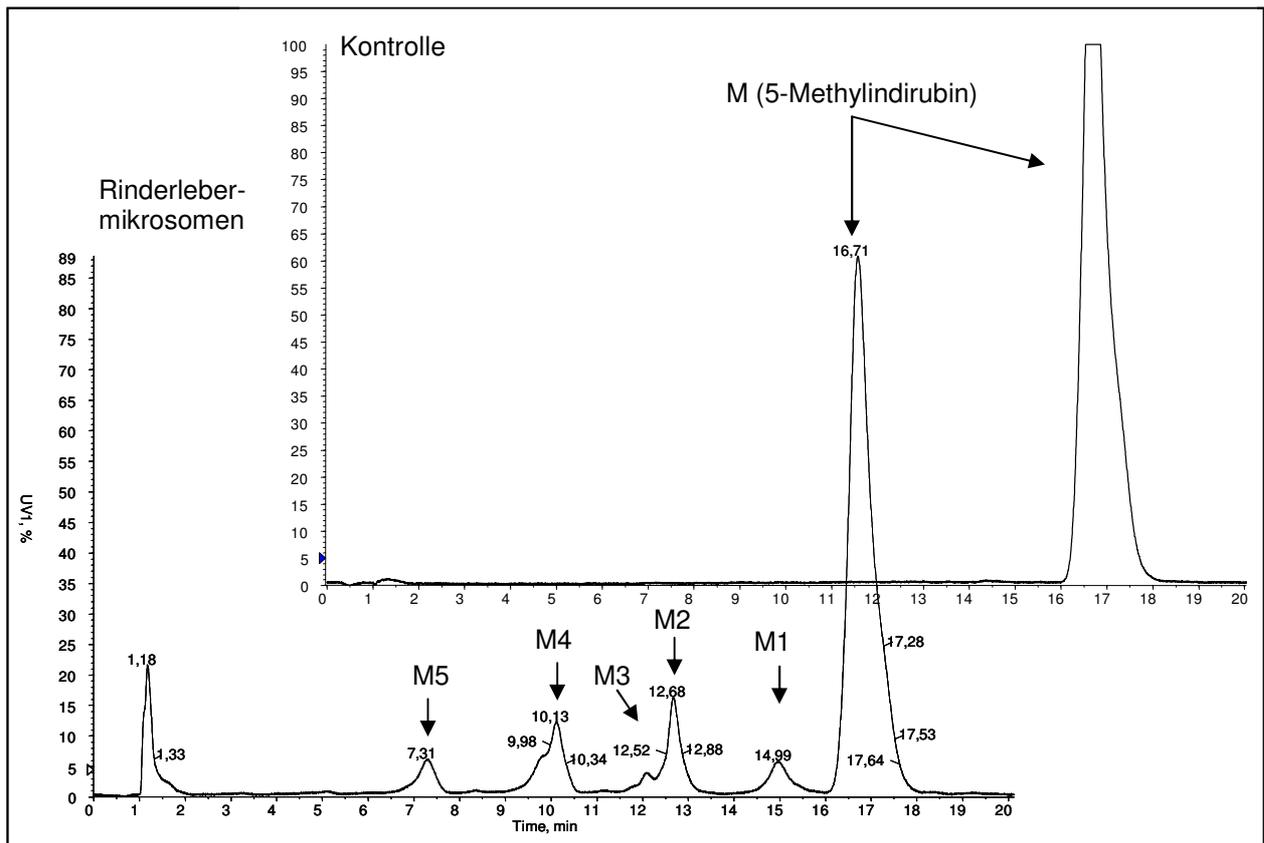


Abbildung 4.1.3 : Inkubation von Rinderlebermikrosomen mit 5-Methylindirubin
Überlagerte UV-Chromatogramme von Kontrolle (hitzenaturierten Mikrosomen) und aktiven Rinderlebermikrosomen

Eine Aussage über die Veränderung der Molmasse der einzelnen Metaboliten im Vergleich zu 5-Methylindirubin erhält man durch die parallel aufgenommenen Massenspektren. Hierzu wird für jede Verbindung über das zugehörige Retentionszeitintervall des Chromatogramms das gleichzeitig aufgezeichnete Massenspektrum über diese Zeitspanne generiert und interpretiert. Bei der eingesetzten Ionisationstechnik handelt es sich um das Turboionenspray, eine besonders milde Ionisationstechnik, bei der hauptsächlich das Molekülion entsteht.

In Abbildung 4.1.4 ist das Massenspektrum des **Hauptpeaks M** über das Retentionszeitintervall von 16,6 bis 17,0 Minuten dargestellt. Wie bereits durch den Vergleich der UV-Chromatogramme der Kontrolle und der Inkubation aus Abbildung 4.1.2 festgestellt wurde, belegt ebenfalls das zugehörige Massenspektrum (Abbildung 4.1.4), dass es sich um die Ausgangsverbindung 5-Methylindirubin handelt. Dies belegt der intensivitätsstärkste Peak bei $m/z = 277,2$ der dem Molekülpeak M von 5-Methylindirubin mit angelagertem Proton $[M+H]^+$ entspricht. Ein zusätzliches Signal bei $m/z = 299,1$ ist eindeutig dem Clusterion $[M+Na]^+$ zuzuordnen.

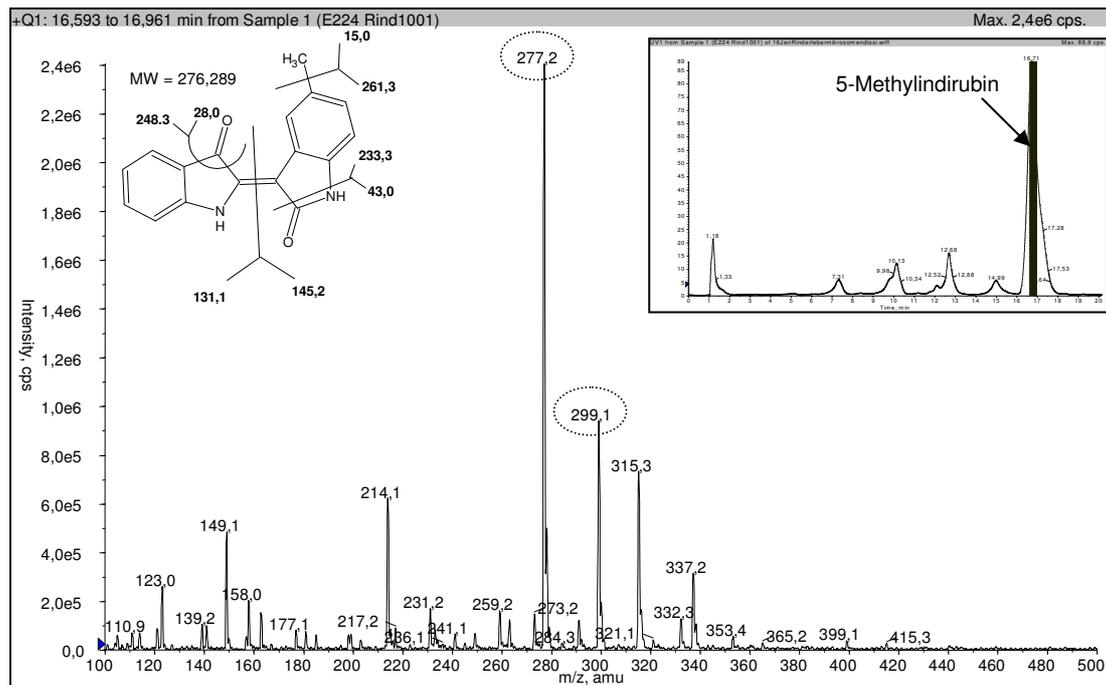


Abbildung 4.1.4: Massenspektrum zum UV-Peak mit einer RT = 16,6 – 17,0 min (M)

Um ein intensiveres Fragmentmuster zu erhalten muss in einem MS/MS-Experiment die Fragmentierung durch kollisionsaktivierte Dissoziation (CAD) induziert werden. Im Vergleich zu einem MS/MS-Spektrum (siehe Anhang, Abb.2) von reinem 5-Methylindirubin sind in Abbildung 4.1.4 keine charakteristischen Fragmente mehr zu sehen. Die restlichen Signale sind unspezifisch für 5-Methylindirubin und entstehen vermutlich durch Verunreinigungen im Fließmittel oder Weichmacher die sich aus Schläuchen lösen.

Das Massenspektrum zum **Peak M1** mit dem Retentionszeitintervall von 14,8 bis 15,2 Minuten ist in Abbildung 4.1.5 dargestellt. Im Vergleich zum Massenspektrum der Ausgangsverbindung tritt hier ein neues Signal bei $m/z = 293,2$ auf, das um 16 Masseneinheiten größer ist als das Signal des protonierten Molekülpeaks $[M+H]^+$ von 5-Methylindirubin ($m/z = 277,2$). Dies ist durch eine mögliche Einführung eines Sauerstoffatoms in das Molekül zu erklären. Hierbei kann jedoch keine Aussage getroffen werden, ob es sich um eine Hydroxylierung am aromatischen System, an der Methylgruppe oder um eine Epoxidierung handelt. Dieser neue Molekülpeak wird hier als $[M1+H]^+$ bezeichnet. Identisch zu der Ausgangsverbindung findet sich jedoch auch hier ein Signal das um 22 Masseneinheiten höher ist als $[M1+H]^+$. Das Signal ist vermutlich dem Clusterion $[M1+Na]^+$ zuzuordnen. Die restlichen Signale sind auch im Massenspektrum der Ausgangsverbindung, Abbildung 4.1.4, zu finden.

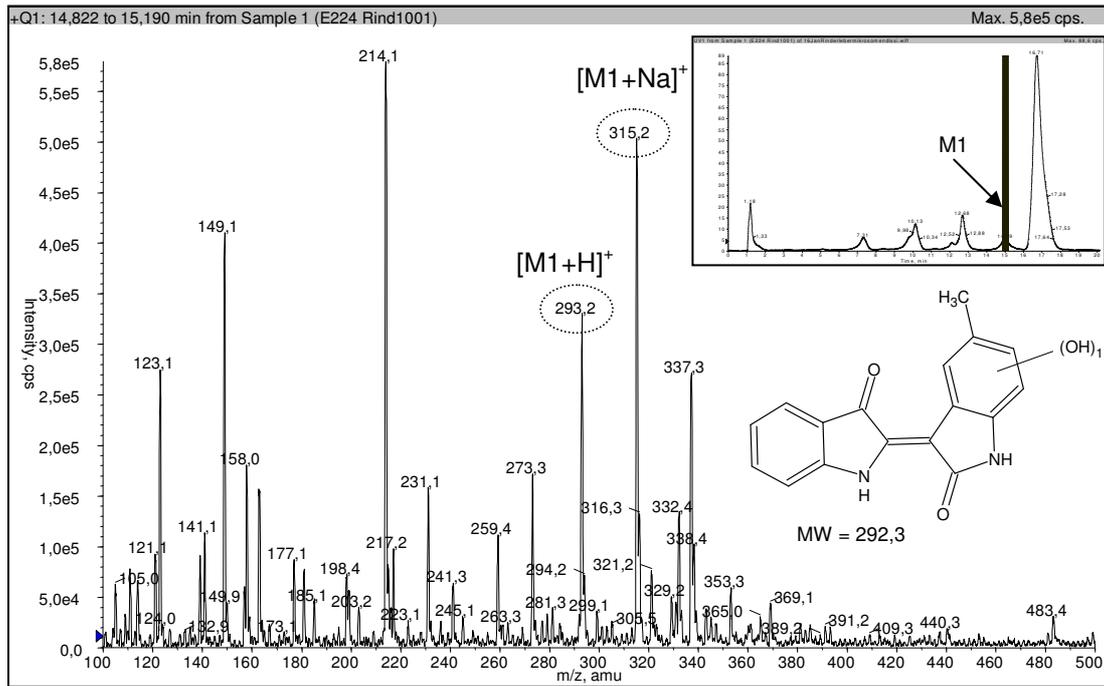


Abbildung 4.1.5: Massenspektrum zum UV-Peak mit einer RT = 14,8 – 15,2 min (**M1**)

In Abbildung 4.1.6 ist das für **Peak M2** zugehörige Massenspektrum des Retentionszeitintervalls von 14,8 bis 15,2 Minuten dargestellt. Es zeigt den größten Peak wiederum bei $m/z = 293,2$ was durch eine Einführung eines Sauerstoff-Atoms zu erklären ist. Da jedoch die Verbindung im UV-Chromatogramm bei einer früheren Retentionszeit auftritt handelt es sich eventuell um ein polareres Isomer von Verbindung M1. Auch hier ist der Molekülpeak mit angelagertem Natrium bei $m/z = 315,2$ zu sehen.

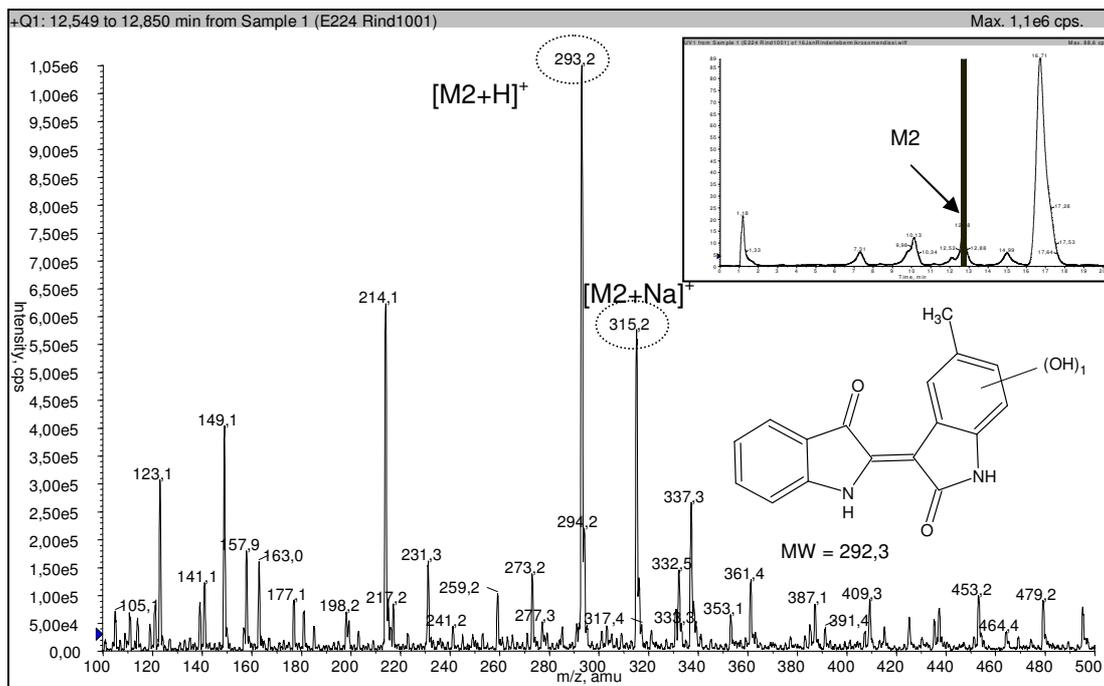


Abbildung 4.1.6: Massenspektrum zum UV-Peak mit einer RT = 12,5 – 12,8 min (**M2**)

Im UV-Chromatogramm tritt direkt neben Peak M2, mit einer Retentionszeit von 12,68 Minuten ein kleiner Peak (s. Abb. 4.1.3), der nicht basislinien-getrennt ist, auf. Dieser **Peak M3** zeigt im zugehörigen Massenspektrum keine wesentlichen Veränderungen gegenüber dem vorherigen Peak. Aus diesem Grund wird auf die Darstellung des zugehörigen Massenspektrums verzichtet.

Das Massenspektrum zu **Peak M4** mit dem Retentionszeitintervall von 12,5 bis 12,8 Minuten ist in Abbildung 4.1.7 dargestellt. Der intensivste Peak findet sich bei $m/z = 275,2$ wobei kein zugehöriges Na-Addukt detektiert werden konnte. Betrachtet man jedoch das Massenspektrum am Anfang des UV-Peaks, in der leichten Schulter, so erkennt man, dass das Signal bei $m/z = 291,1$ im Anfang der Schulter intensiver ist als im Hauptpeak. Alle anderen Signale sind unspezifisch und fortwährend vorhanden. Dies lässt vermuten, dass hier zwei Verbindungen coeluierten und dass vermutlich aus dem Peak $m/z = 291,1$ durch Abspaltung eines Sauerstoffatoms der Peak $m/z = 275,2$ entsteht. Eine Zuordnung der Signale ist durch die Coelution der beiden Verbindungen nicht möglich.

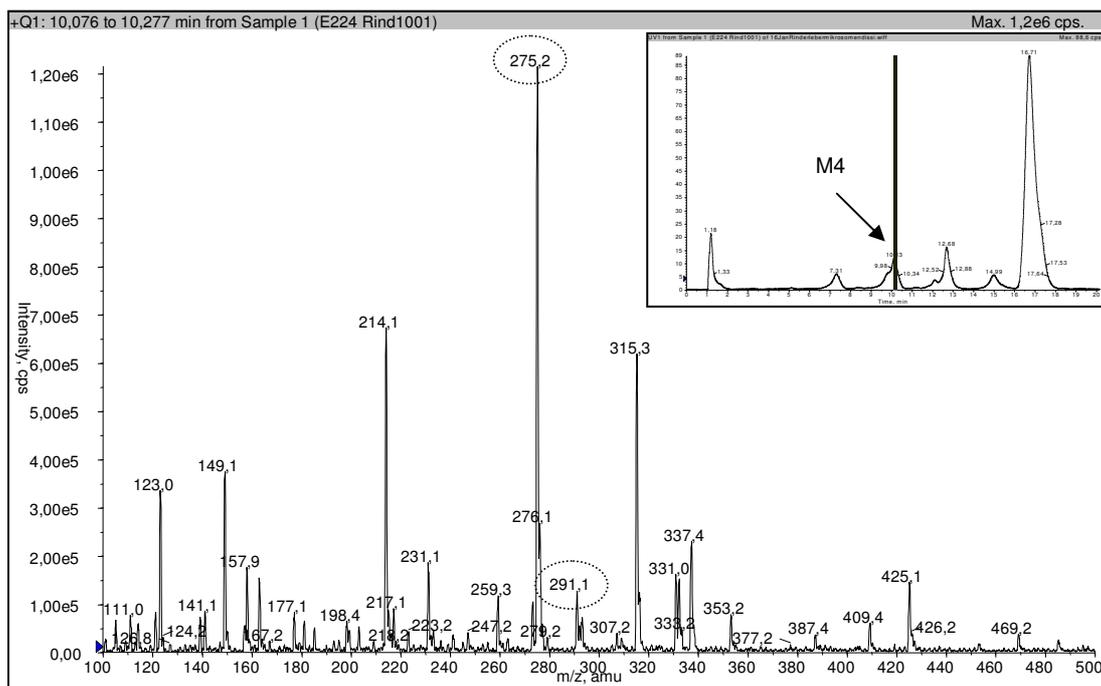


Abbildung 4.1.7: Massenspektrum zum UV-Peak mit einer RT = 12,5 – 12,8 min (**M4**)

UV-Peak M5 mit einem Retentionszeitintervall von 7,2 bis 7,5 Minuten zeigt im zugehörigen Massenspektrum ein intensives Signal bei $m/z = 307,2$ (Abb. 4.1.8). Gegenüber der Ausgangsverbindung 5-Methylindirubin ist das eine Erhöhung um 30 Masseneinheiten. Diese Erhöhung der Masse könnte der Bildung einer Carbonsäure entsprechen und würde die höhere Polarität der Verbindung erklären. Durch Wasserabspaltung könnte das Fragmentation mit m/z

= 289 entstehen. Alle anderen Signale erscheinen in allen Massenspektren und sind unspezifisch.

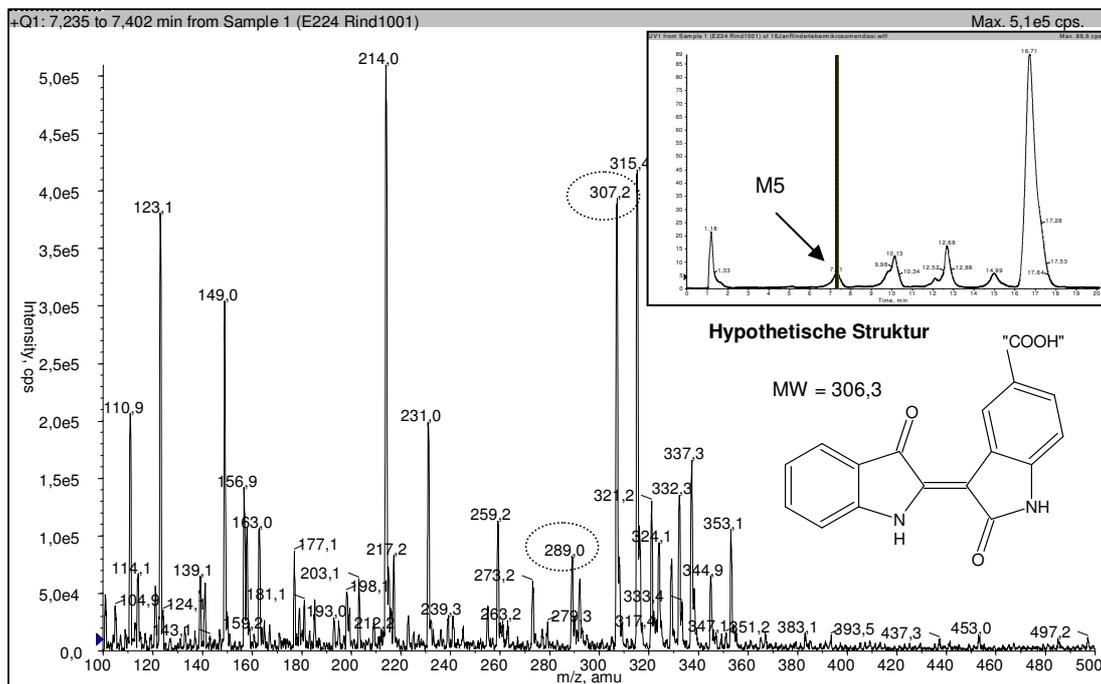


Abbildung 4.1.8: Massenspektrum zum UV-Peak mit einer RT = 7,2 – 7,4 min (M5)

Zusammenfassend geht aus den bisher beschriebenen Ergebnissen hervor, dass durch die Inkubation von 5-Methylindirubin in Rinderlebermikrosomen Metaboliten generiert wurden, von denen fünf getrennt werden konnten. Dabei deuten die Massenzunahmen der Metaboliten auf eine Aufnahme von Sauerstoff der Ausgangsverbindung hin (vgl. Tab. 4.1.2). Die genaue Identität der Metaboliten konnte auf diesem Weg allerdings nicht geklärt werden.

Tabelle 4.1.2: Informationen zu den Metaboliten, die durch Inkubation von 5-Methylindirubin mit Rinderlebermikrosomen generiert wurden

UV-Peak (Retentionszeit)	<i>m/z</i>	Zuordnung
M (16,7 min)	277,2	[M+H] ⁺ = 5-Methylindirubin
	299,1	[M+Na] ⁺
M1 (15,0 min)	293,2	[M1+H] ⁺ = [M+OH] ⁺ = „Hydroxylierung“
	315,2	[M1+Na] ⁺ = [M +Na+OH] ⁺
M2 (12,7 min)	293,2	[M2+H] ⁺ = [M+OH] ⁺ = „Hydroxylierung“
	315,2	[M2+Na] ⁺ = [M+Na+OH] ⁺
M3 (12,1 min)	Siehe M2	Siehe M2
M4 (10,1 min)	291,1	? [M4+H] ⁺
	275,2	? [M4+H-O] ⁺
M5 (7,3 min)	307,2	[M5+H] ⁺ = [M+H+2O-2H] ⁺ = „Carbonsäure“
	289,0	[M5+H-H ₂ O] ⁺

4.1.1.2.2 Inkubation mit Schweinelebermikrosomen

Die Inkubationen mit Schweinelebermikrosomen werden analog zu den Untersuchungen mit Rinderlebermikrosomen durchgeführt. Ihr Cytochrom P450 Gehalt ist gleich hoch, so dass die Inkubationszeit von 2 Stunden übernommen wird.

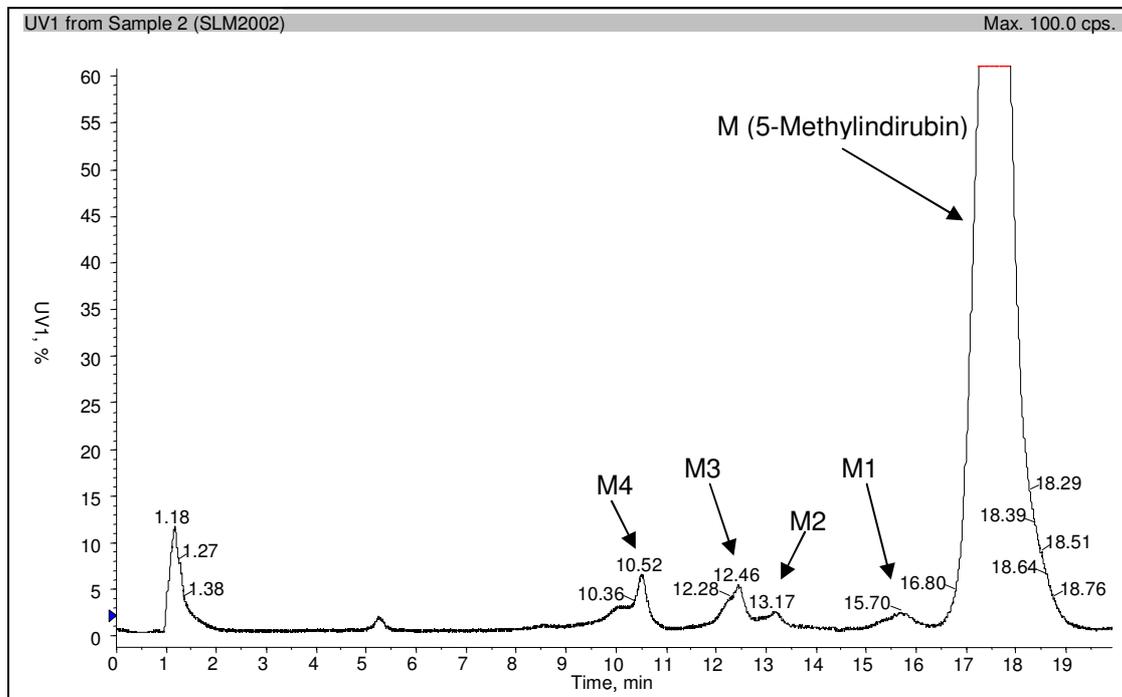


Abbildung 4.1.9: UV-Chromatogramm der Inkubation von Schweinelebermikrosomen mit 5-Methylindirubin **6**

Aus dem UV-Chromatogramm aus Abbildung 4.1.9 geht hervor, dass 4 Metaboliten M1-M4 gebildet wurden. Aus den Retentionszeiten ist erkennbar, dass die Retentionszeit der Ausgangsverbindung, 5-Methylindirubin, um ca. 1 Minute nach hinten verschoben wurde, was durch Temperaturschwankungen oder Unregelmäßigkeiten im Gradientenmischer hervorgerufen werden kann. Berücksichtigt man die relative Verschiebung bei allen Peaks, so ist erkennbar, dass die 4 entstanden Verbindungen bei den gleichen Retentionszeiten wie die Metaboliten der Inkubation mit Rinderlebermikrosomen eluieren. Diese Vermutung wird auch von den zugehörigen Massenspektren gestützt. Die zeigen die gleichen Massenzunahmen wie bei der Inkubation mit Rinderlebermikrosomen und werden deshalb hier nicht dargestellt. Der Metabolit M5 der Inkubation mit Rinderlebermikrosomen konnte hier jedoch nicht detektiert werden.

4.1.1.2.3 Inkubation mit Rattenlebermikrosomen

4.1.2.3.1 Inkubation mit nicht induzierten Rattenlebermikrosomen

Das UV-Chromatogramm der Inkubation von nicht induzierten Rattenlebermikrosomen zeigt unter den gleichen Inkubationsbedingungen wie bei Rinder- und Schweinelebermikrosomen ein schwächer ausgeprägtes Metabolitenspektrum, was durch den niedrigeren Cytochrom P450 Gehalt erklärbar ist (s. Tab. 4.1.1). Es konnten nur drei Metaboliten getrennt werden, wobei ihre Retentionszeiten mit drei von fünf UV-Peaks aus der Rinderlebermikrosomen-Inkubation übereinstimmen. Die zugehörigen Massenspektren sind nahezu identisch und weisen die gleichen Massenzunahmen wie bei der Inkubation mit Rinderlebermikrosomen auf. Die UV-Peaks der Metaboliten M1 (RT = 14,99 min) und M5 (RT = 7,31 min) der Rinderlebermikrosomen konnten hier nicht detektiert werden. Am deutlichsten wird M4 mit der Retentionszeit 10,18 min und dem charakteristischen Signal bei $m/z = 275,2$ gebildet.

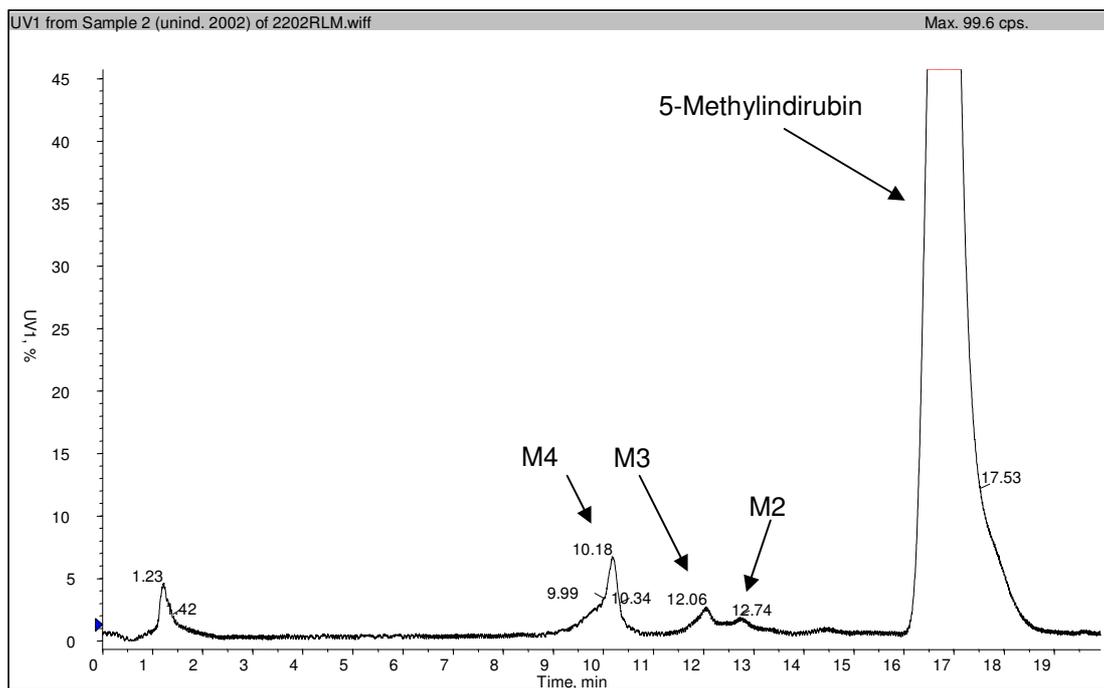


Abbildung 4.1.10 : UV-Chromatogramm der Inkubation von nicht induzierten Rattenlebermikrosomen mit 5-Methylindirubin **6**

4.1.1.2.3.2 Inkubation mit Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen

Die Expression der CYP450 Enzyme wird durch einmalige i.p. Gabe von 20 mg Aroclor induziert. Aroclor induziert besonders die Expression von Isoenzymen der CYP 1A-Subfamilie indem es an den Ah (Aromatic hydrocarbon)-Rezeptor bindet, der in Kombination mit einem weiteren Protein Arnt (Ah receptor nuclear translocator), die Transkription initiiert [Whitlock et al., 1995].

Wird der Inkubationsansatz unter den bisher verwendeten Bedingungen mit 1 mg/ml mikrosomalen Protein und einer Inkubationszeit von 2 Stunden durchgeführt, so sind weder Metaboliten noch Ausgangsverbindung in der Aufarbeitung zu detektieren.

Eine durchgeführte Zeitkinetik belegt, dass bereits nach 20 Minuten die Konzentration der Metaboliten weit höher ist als die der Ausgangsverbindung (s. * in Abb. 4.1.11).

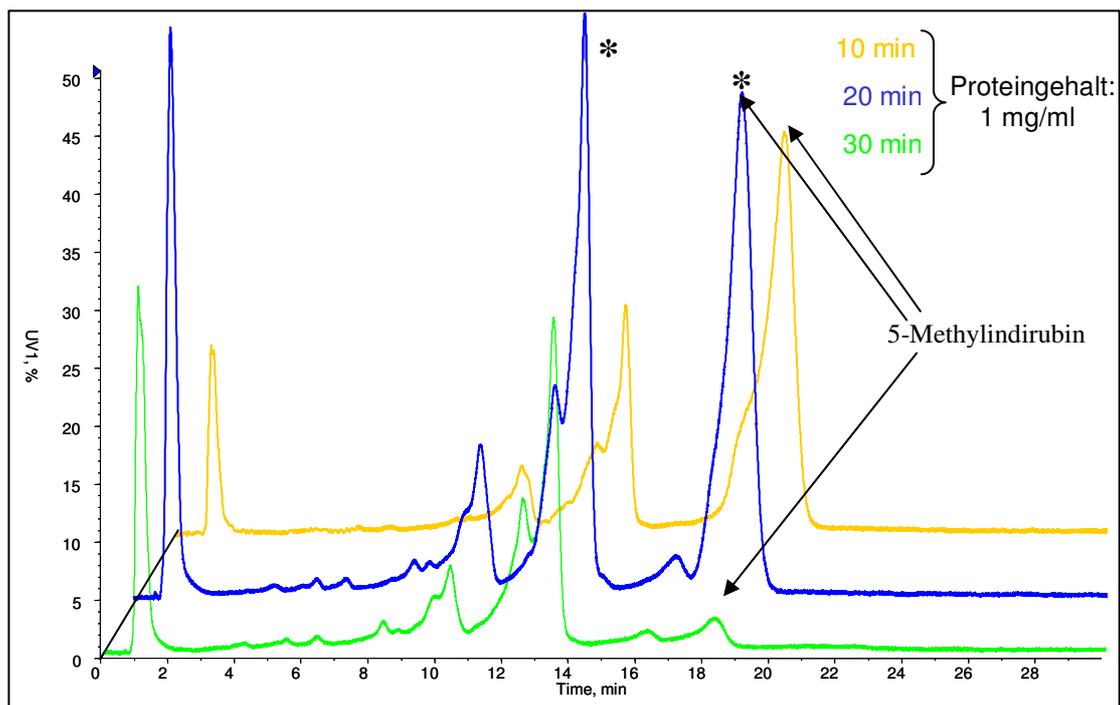


Abbildung 4.1.11 : Inkubation von Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit 5-Methylindirubin (6) mit unterschiedlichen Inkubationszeiten (Proteinkonzentration: 1mg/ml, Cytochrom P450 = 1,09 nmol/mg Protein)

Weitere Versuche mit verschiedenen Proteinkonzentrationen (Abb. 4.1.12, Inkubationszeit: 1h) zeigen, dass die Halbierung der Proteinkonzentration von 1 mg/ml auf 0,5 mg/ml ein ausgeprägtes Muster der verschiedenen Metabolite ergibt und der Peak der Ausgangsverbindung noch deutlich erkennbar ist (s. Abb. 4.1.12, schwarzes Chromatogramm).

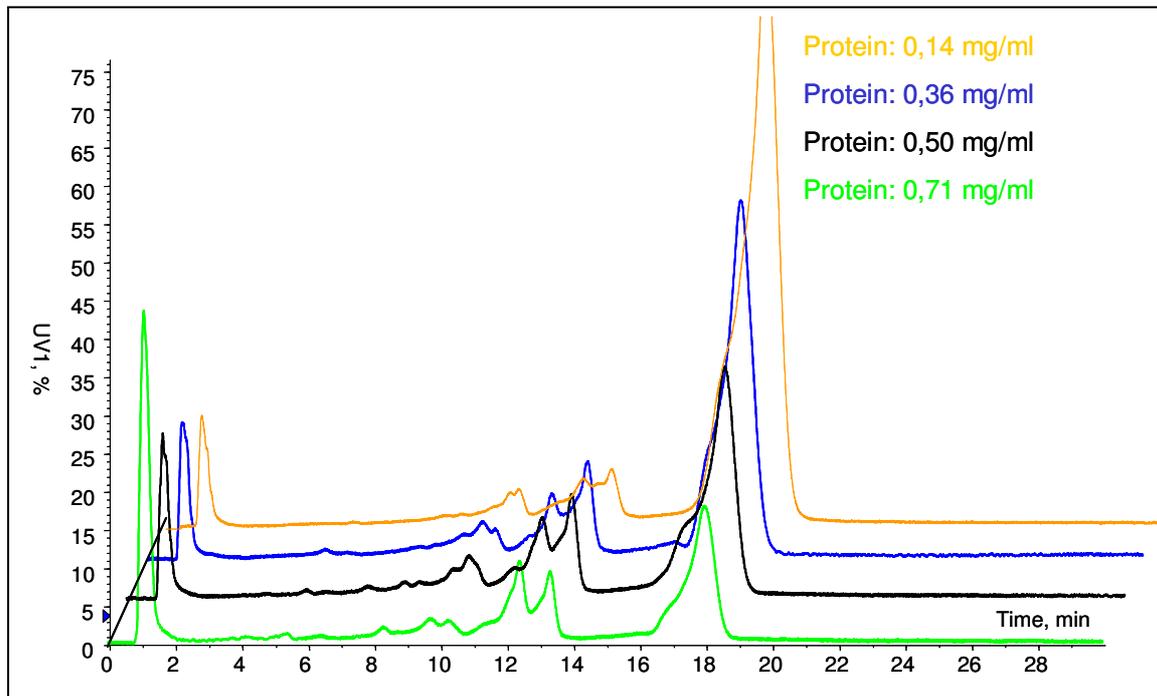


Abbildung 4.1.12 : Inkubation von Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit 5-Methylindirubin (6) mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (Inkubationszeit: 1h, Cytochrom P450 = 1,09 nmol/mg Protein)

Das UV-Chromatogramm der Inkubation über 1 Stunde mit 0,5 mg/ml Protein ist in Abbildung 4.1.13 vergrößert dargestellt. Allgemein sind die Metaboliten, die auch bei der Inkubation mit nicht induzierten Rattenlebermikrosomen auftreten, hier mengenmäßig stärker vertreten. Dies lässt vermuten, dass die aroclorinduzierbaren P-450-Enzyme 1A1, 1A2, 2B1 und 2B2 an der *in vitro*-Verstoffwechslung von 5-Methylindirubin beteiligt sind. Im Vergleich zum UV-Chromatogramm der Inkubation mit nicht induzierten Rattenlebermikrosomen tritt ein zusätzlicher Peak bei 15,46 Minuten auf, der auch bei der Inkubation mit Rinderlebermikrosomen auftritt.

Der UV-Peak M1 bei RT =15,5 Minuten ergibt ein Massenspektrum, das sehr ähnlich zu M1 aus der Rinderlebermikrosomeninkubation ist (nicht abgebildet).

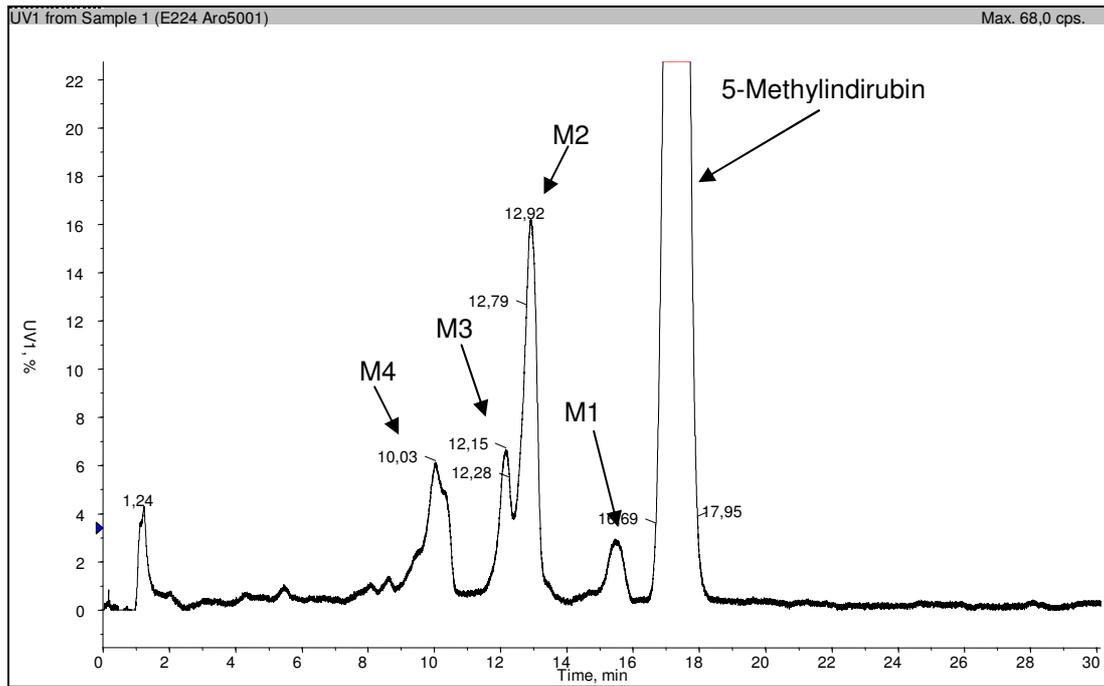


Abbildung 4.1.13: Inkubation von Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit 5-Methylindirubin
UV-Chromatogramm

Das Massenspektrum zu **Peak M2** (RT = 12,9 Min) ähnelt stark dem vergleichbaren Massenspektrum der Inkubation mit Rinderlebermikrosomen. Der intensivste Peak ist bei $m/z = 293,2$ zu erkennen. Während bei der Inkubation mit Rinderlebermikrosomen für das Massenspektrum von M3 keine Veränderung zu M2 zu beobachten war, tritt hier ein deutliches Signal bei $m/z = 309,2$ hervor. Zusätzlich ist erkennbar, dass die zeitliche Zunahme der Peakfläche M3 im UV-Chromatogramm mit einer zeitlichen Abnahme der Fläche von Peak M2 einhergeht. Hieraus kann man folgern, dass M3 ein Sekundärmetabolit ist. Vermutlich handelt es sich hier um eine Dihydroxyverbindung (Massenzunahme zu 5-Methylindirubin $\Delta=2 \cdot 16$).

Aus den restlichen Massenspektren geht hervor, dass es sich um dieselben Oxidations-Produkte handelt wie bei der Inkubation mit Rinderlebermikrosomen. Zusammenfassend sind die Ergebnisse der durchgeführten Inkubationen in Tabelle 4.1.3 dargestellt:

Tabelle 4.1.3: Daten-Zusammenstellung der Inkubation von **6**

UV-Peak (Retentionszeit)	m/z	Zuordnung
M (16,71 min)	277,2	$[M+H]^+ = 5\text{-Methylindirubin}$
M1 ^{a)b)d)} (14,99 min)	293,2 315,2	$[M1+H]^+ = [M+OH]^+ = \text{„Hydroxylierung“}$ $[M1+Na]^+ = [M+Na+OH]^+$
M2 ^{a)b)c)d)} (12,68 min)	293,2 315,2 278,2	$[M2+H]^+ = [M+OH]^+ = \text{„Hydroxylierung“}$ $[M2+Na]^+ = [M+Na+OH]^+$ $[M2+H-CH_3]^+ = [M+OH-CH_3]^+$

		⇒ „Monohydroxylierung am aromatischen System“
M3 ^{a)b)c)d)} (12,15 min)	309,2 294,0	[M3+H] ⁺ = [M+2OH] ⁺ „Doppelte Hydroxylierung“ [M3+H-CH ₃] = [M+2OH-CH ₃] ⁺ ⇒ „Hinweis auf Dihydroxylierung am aromatischen System“
M4 ^{a)b)c)d)} (10,13 min)	291,1 275,2	[M4+H] ⁺ = [M+H+O-2H] ⁺ = „Aldehyd“ ? [M4+H-O] ⁺
M5 ^{a)} (7,31 min)	307,0 289,0	[M5+H] ⁺ = [M+H+2O-2H] ⁺ = „Carbonsäure“ ? [M5+H-H ₂ O] ⁺

Generiert in: ^{a)} Rinderlebermikrosomen ^{c)} uninduzierten Rattenlebermikrosomen
^{b)} Schweinelebermikrosomen ^{d)} aroclorinduzierten Rattenlebermikrosomen

4.1.1.2.4 Identifizierung der Metaboliten

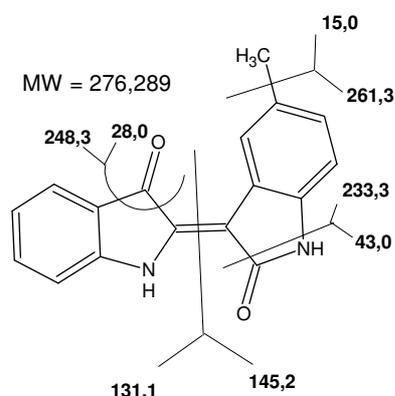
Zur Identifizierung der Metaboliten wurden unter ausgewählten Bedingungen die Metabolite M2 und M3 mit Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen generiert (Proteinkonzentration: 1 mg/ml; Inkubationszeit 1 h). Die Metaboliten wurden dünnschichtchromatographische (RP-Phase) getrennt und durch Extraktion der einzelnen Spots mittels Methanol gewonnen. Die so erhaltene Menge an M2 und M3 war ausreichend, um eine Charakterisierung mittels MS/MS und ¹H-NMR durchzuführen [Schmitt, 2001].

4.1.1.2.4.1 MS/MS-Daten

Von der isolierten Reinsubstanz sowie der Ausgangsverbindung wurde ein Produktionenscan durchgeführt. Die Proben wurden in DMSO gelöst und direkt bei einem Flow von 10 µl/min in das MS-Gerät injiziert. Dabei wurde in Quadrupol Q1 das Molekülion selektiert, in Quadrupol Q2, der Kollisionszelle, das Molekülion fragmentiert und in Quadrupol Q3 die entstandenen Fragmente gemessen.

4.1.1.2.4.1.1 MS/MS-Daten von 5-Methylindirubin

Aus den Ergebnissen der MS/MS-Spektren (Tab. 4.1.4 und s. Anhang Abb. 2) geht hervor, dass 5-Methylindirubin ein Teilchen der Masse 15 abspaltet. Indikativ kann es sich hierbei um die Abspaltung der Methyl-Gruppe handeln, da in einem MS/MS-Vergleichsspektrum von Indirubin eine 15 amu-Abspaltung nicht zu beobachten ist (s. Anhang Abb. 1). Zusätzliche Abspaltungen, die auch für Indirubin zu beobachten sind, ist die Abspaltung eines 28 amu Teilchens, was einer CO-Abspaltung entsprechen kann. Die Abspaltung eines Teilchens mit 43 bzw. 44 amu ist charakteristisch für einer HNCO- bzw. HNHCO-Struktur ist [Blanz, 1989].

Tabelle 4.1.4 : Molekül- und Fragmentionen für 5-Methylindirubin **6**, (s. Anhang Abb. 2)

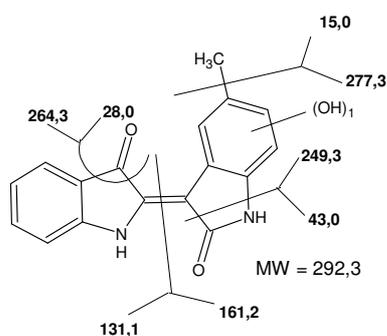
<i>m/z</i>	Differenz	Interpretation
277,0	----	[M+H] ⁺
262,2	15	[M+H] ⁺ -CH ₃
258,4	18-19	[M+H] ⁺ -H ₂ O
249,1	28	[M+H] ⁺ -CO
234,0	43	[M+H] ⁺ -HNCO
233,4	44	[M+H] ⁺ -HNHCO
219,2	58	[M+H] ⁺ -2HCO
205	72	[M+H] ⁺ -CO-HCO-CH ₃
190,4	87	----
175,8	101,2	----
151,8	125,2	----
129,4	147,6	----

4.1.1.2.4.1.2

MS/MS-Daten von Metabolit M2

Das MS/MS-Spektrum von M2 ist im Anhang, Abbildung 3a und 3b dargestellt. M2 besitzt ein protoniertes Molekülion bei $m/z = 293,2$. Dies entspricht im Vergleich zu 5-Methylindirubin einer Zunahme von 16 amu. Auch ist hier eine 15 amu-Abspaltung zu beobachten, was auf eine intakte Methyl-Gruppe hindeutet. Daher kann vermutet werden, dass eine Hydroxylierung an einem der beiden aromatischen Ringe stattgefunden hat. Eine Abspaltung einer NH-Gruppe wird ausgeschlossen da eine solche Abspaltung nicht bei Indirubin beobachtet wurde. Anschließend findet man noch die für Indirubine charakteristische Abspaltungen von 28 und 44 amu (siehe Tabelle 4.1.5).

Tabelle 4.1.5: Molekül- und Fragmentionen für Metabolit M2 mit hypothetischen Strukturvorschlag (s. Anhang Abb. 3a+b)



<i>m/z</i>	Differenz	Interpretation
293,2	----	[M2+H] ⁺
278,2	15	[M2+H] ⁺ -CH ₃
276,6	16	[M2+H] ⁺ -OH
265,0	28	[M2+H] ⁺ -CO
262,8	30	[M2+H] ⁺ -CH ₃ NH
248,6	44	[M2+H] ⁺ -HNHCO
218,9	74	[M2+H] ⁺ -2CO-H ₂ O

193,0	100	----
190,0	103	----

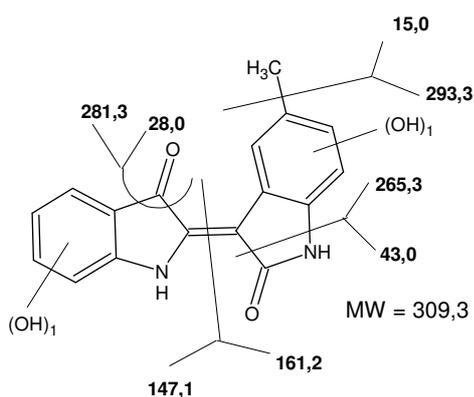
4.1.1.2.4.1.3

MS/MS-Daten von Metabolit M3

Der Molekülpeak von M3 ist bei $m/z = 309,2$ zu finden. Dies entspricht einer Massenzunahme von 32 amu gegenüber der Ausgangsverbindung sowie eine Zunahme von 16 amu gegenüber M2. Da der UV-Peak des Metaboliten M3 mit zunehmender Inkubationszeit anwächst und der Peak von M2 gleichzeitig abnimmt, kann man folgern, dass M3 ein Sekundärmetabolit von M2 ist. Folglich könnte die Zunahme des Molekulargewichts um 32 amu bzw. 16 amu auf der Dihydroxylierung von 5-Methylindirubin bzw., Hydroxylierung von M2 basieren. Das MS/MS-Spektrum von M3 ist im Anhang, Abb. 4 dargestellt.

Charakteristisch ist auch hier die Abspaltung der intakten Methyl-Gruppe (-15 amu) sowie der HNHCO-Gruppe (-44 amu) zu beobachten. Ein weiteres bisher noch nicht gefundenes Fragmentation tritt bei $m/z = 148,2$ auf. Es könnte durch eine mögliche Spaltung der Doppelbindung zwischen beiden Ringsystemen entstanden sein, wenn die zweite Hydroxylierung am unsubstituierten Ring des 5-Methylindirubins stattgefunden hat.

Tabelle 4.1.6: Molekül- und Fragmentationen für Metabolit M3 mit hypothetischen Strukturvorschlag, (s. Anhang Abb. 4)



m/z	Differenz	Interpretation
309,2	----	$[M3+H]^+$
294,0	15	$[M3+H]^+-CH_3$
273,4	36	$[M3+H]^+-X$
265,0	44	$[M3+H]^+-HNHCO$
258,8	50	$[M3+H]^+-X$
248,4	61	$[M3+H]^+-CO-H_2O-CH_3$
238,0	71	$[M3+H]^+-2CO-CH_3$
218,8	90	$[M3+H]^+-X$
209,4	100	$[M3+H]^+-X$
148,2	161	$[M3+H]^+-$ methylsubstituiertes Ringsystem
120,8	189	$[M3+H]^+-$ methylsubstituiertes Ringsystem- CO

4.1.1.2.4.1 $^1\text{H-NMR}$ von M2 und M3

Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren sowie ihre Zuordnung sind im Anhang, Abbildung 5 und 6 aufgeführt und werden in Kapitel 4.5 zum Vergleich mit den $^1\text{H-NMR}$ -Daten der synthetisierten Metaboliten verwendet.

Die Identifizierung der Metaboliten **M2** und **M3** erfolgt über die Signale der aromatischen Protonen, die im Bereich von $\delta = 6 - 11$ ppm zu erkennen sind.

Als Metabolit **M2** wurde das 6-Hydroxy-5-methyl-indirubin und Metabolit **M3** das 6,7'-Dihydroxy-5-methyl-indirubin charakterisiert ($^1\text{H-NMR}$ -Spektren s. Anhang Abb.5+6).

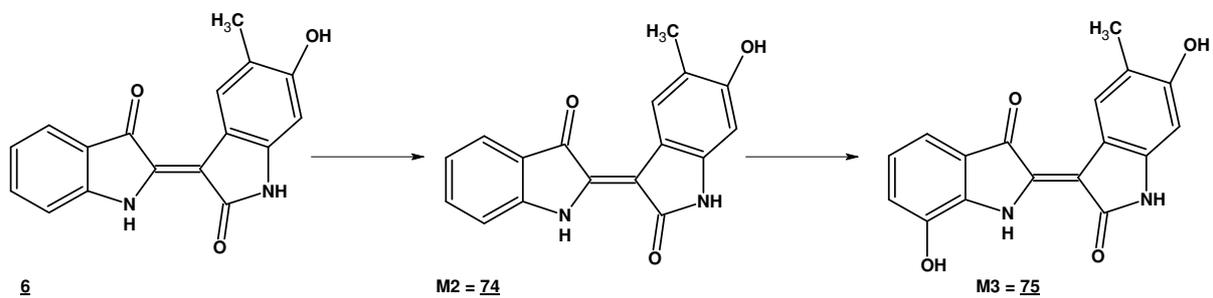


Abbildung 4.1.14 : Aus 5-Methylindirubin **6** mittels Lebermikrosomen generierte Metaboliten

Die identifizierten Metaboliten werden im zweiten Teil (siehe Kapitel 4.2) dieser Arbeit synthetisiert und anschließend im Sulforhodamin B-Test (SRB-Test) auf ihre Wirksamkeit an verschiedenen Tumorzelllinien getestet (s. Kap.4.4.1).

4.1.2 Untersuchungen zum oxidativen in-vitro-Metabolismus von ausgewählten Indirubin-Derivaten

Zusätzlich zu der Hauptverbindung dieser Arbeit, 5-Methylindirubin **6**, wurden weitere Indirubin-Derivate auf ihren *in vitro*-Metabolismus bei Inkubation mit Lebermikrosomen getestet. So soll der Einfluss unterschiedlicher Substituenten auf das Metabolisierungsmuster untersucht werden. Hierzu werden, wenn nicht anders erwähnt, nur Aroclor-induzierte Rattenlebermikrosomen auf Grund ihrer höheren metabolischen Aktivität verwendet. Jeder Inkubationsansatz wird identisch zu Kapitel 6.4.1 durchgeführt. Die Inkubationszeiten werden entsprechend der Aktivität der eingesetzten Mikrosomen variiert (10, 20, 30, 45 und 70 Min). Es wird jeweils ein Ansatz mit hitzedenaturierten Mikrosomen, bzw. ein Kontrollansatz ohne Zugabe von Cofaktoren als Kontrolle mitgeführt. Die Analyse der Inkubationsansätze wird unter denselben Trennbedingungen wie bei 5-Methylindirubin durchgeführt.

4.1.2.1 Metabolismus von 5-Methoxyindirubin (**40**)

Bei der Inkubation von 5-Methoxyindirubin **40** mit Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen tritt als unpolare Verbindung der UV-Peak **M** der Ausgangsverbindung **40** (RT = 19,9 min) auf, was Blindprobe sowie das zugehörige Massenspektrum belegen. Bereits nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten ist der UV-Peak **M3** größer als der der Ausgangsverbindung **M**. 5-Methoxyindirubin **40**, besitzt somit in Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen, eine fast identische Umsatzrate wie 5-Methylindirubin **6** (s. Abb. 4.1.11 u. 4.1.15).

Die charakteristischen Fragmentationen zu 5-Methoxyindirubin werden in einem separat aufgenommenen MS/MS-Spektrum der Reinsubstanz ermittelt (Anhang, Abb. 7). Die Zuordnung der einzelnen Fragmente ist in Tabelle 4.1.7 unter M0 aufgelistet.

Aus dem zu UV-Peak **M** gehörenden Massenspektrum (Anhang, Abb. 8) erkennt man deutlich den protonierten Molekülpeak $[M+H]^+$ der Ausgangsverbindung ($m/z = 293,7$) sowie das Clusterion $[M+Na]^+$ $m/z = 315,9$. Zusätzlich tritt schwach bei $m/z = 278,3$ ein weiterer Peak auf, der eindeutig 5-Methoxyindirubin zugeordnet werden kann. Es handelt sich hierbei um die Fragmentation nach Abspaltung einer Methyl-Gruppe. Weitere Zuordnungen können auf Grund der schwachen Intensität der Signale nicht gemacht werden.

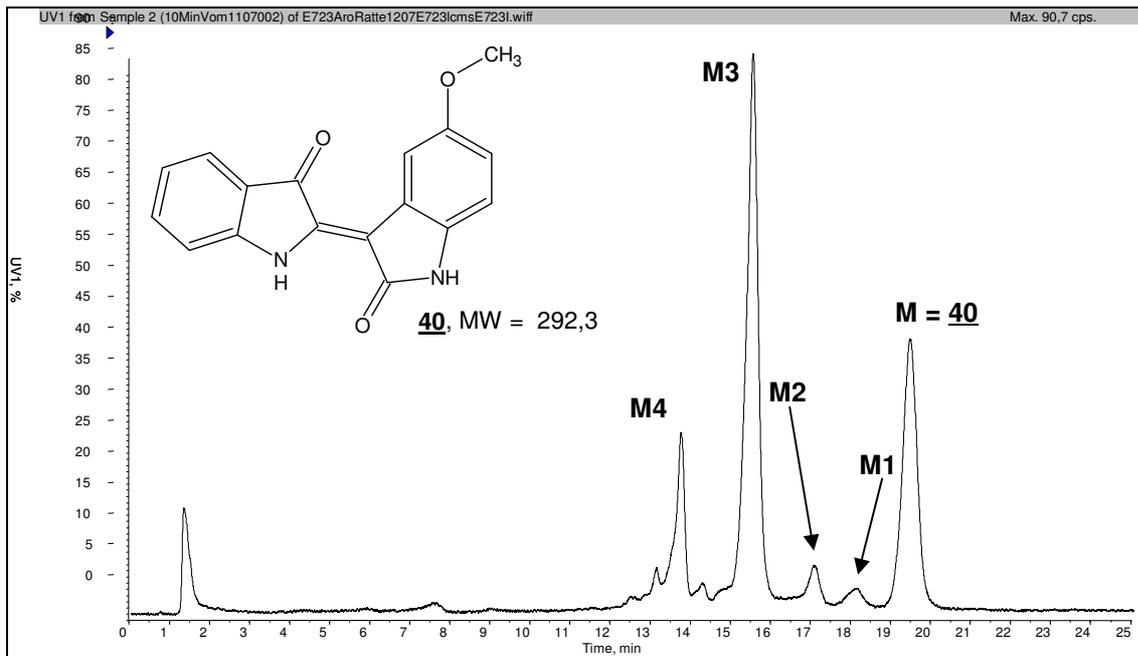


Abbildung 4.1.15: Inkubation von Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit **40**, UV-Chromatogramm. Inkubationsdauer: 10 min, Cytochrom P450 = 1,09 nmol/mg Protein

Aus den zu den UV-Peaks **M1** bis **M4** zugehörigen Massenspektren können nur aus den MS-Daten zu **M3** Hinweise auf eine metabolische Strukturveränderung der Ausgangssubstanz gefunden werden (Anhang, Abb. 9). Im Massenspektrum von **M3** tritt ein intensiver Peak bei $m/z = 309,4$ auf. Diese Masse ist im Vergleich zur Ausgangsverbindung um 16 amu erhöht, so dass es sich hier um das protonierte Moleküllion eines neuen Metaboliten handeln könnte, der durch eine einfache Hydroxylierung der Ausgangsverbindung entstanden ist. Der entsprechende Molekülpeak mit angelagertem Natrium-Ion ist ebenfalls bei $m/z = 331,6$ erkennbar. Das Signal bei $m/z = 293,5$ ist durch ein Fragmention zu erklären, das durch Abspaltung einer OH-Gruppe, der Peak bei $m/z = 277,6$ durch eine weitere Abspaltung einer Methyl-Gruppe zu erklären. Dies kann ein Hinweis dafür sein, dass die Methoxy-Gruppe der Ausgangsverbindung nicht verändert wurde und somit eine Hydroxylierung am aromatischen System des Indirubin-Grundgerüsts stattgefunden hat (s. Tab. 4.1.7).

Tabelle 4.1.7: Übersicht der UV- und MS-Daten der Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen-Inkubation von **40**

UV-Peak (Retentionszeit)	m/z	Zuordnung
M0 MS/MS-Exp.	293,2	$[M+H]^+$
	278,0	$[M+H-CH_3]^+$
	261,0	$[M+H-CH_3-OH]^+$
	250,2	$[M+H-CH_3-CO]^+$
M (19,9 min)	315,9	$[M+Na]^+$
	293,7	$[M+H]^+$

	278,3	$[M+H-CH_3]^+$
M1 (18,6 min)		
M2 (17,4 min)		
M3 (15,9 min)	331,6 309,4 293,5 277,6	$[M3+Na]^+ = [M+O+Na]^+$ $[M3+H]^+ = [M+H+O]^+$ $[M3 - OH]^+$ $[M3- OH - CH_3]^+$ Hinweis auf Monohydroxylierung von M
M4 (14,0 min)		

4.1.2.2 Metabolismus von 5-Bromindirubin (**39**)

5-Brom-indirubin **39** hemmt Tumorzellwachstum von MCF-7-Zellen im SRB-Test mit einem IC_{50} -Wert von 8 μ M und zeigt eine Hemmung des isolierten CDK1/Cylin B-Komplex von $IC_{50}=0,35$ μ M. [Hössel, 1999b]. 5-Bromindirubin ist, auf Grund seiner zwei Br-Isotopen (^{79}Br , ^{81}Br) gut im Massenspektrometer zu erkennen. Neben dem Molekülion der Brom-Verbindung tritt, um zwei Masseneinheiten erhöht, noch ein zusätzlicher Isotopenpeak mit fast identischer Intensität (98%) auf [Hesse, 1995] (s. Anhang, Abb.11).

Die Inkubation von 5-Bromindirubin erfolgte wiederum mit Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen. Das separat aufgenommene MS/MS-Spektrum der Reinsubstanz liefert das Fragmentierungsmuster der Ausgangsverbindung (siehe Anhang, Abbildung 10). Die für 5- Bromindirubin spezifischen Fragmente sind in Tabelle 4.1.8 unter M0 erläutert.

Das UV-Chromatogramm (Abb. 4.1.16) der Inkubation zeigt neben dem Peak der Ausgangsverbindung (RT = 23,1 min) noch drei weitere Peaks wobei die zugehörigen Massenspektren sehr intensitätsschwach sind.

Aus dem Massenspektrum des intensivsten UV-Peaks **M** (Anhang, Abb. 11) ist deutlich der Doppelpeak (resultierend aus den beiden Br-Isotopen) des protonierten Molekülpeaks $[M+H]^+$ bei $m/z = 341,1$ und $343,2$ zu erkennen. Ebenfalls belegen die aus dem MS/MS-Spektrum der Ausgangsverbindung **39** bekannte Fragmente, dass es sich bei diesem Peak um die Ausgangsverbindung 5-Bromindirubin handelt.

Die Massenspektren der UV-Peaks **M1** bis **M3** sind sehr intensitätsschwach und ergeben, bis auf UV-Peak **M3**, keine neuen Signale im Vergleich zur Ausgangsverbindung. Dies ist möglicherweise durch eine für die Metaboliten ungünstige Einstellung der substanzspezifischen Parameter des Massenspektrometers erklärbar. Diese Parameter sind spezifisch auf die Ausgangsverbindung optimiert da eine Optimierung auf die bisher unbekannt Metaboliten nicht möglich ist und entsprechen in diesem Fall nicht den optimalen Parametern.

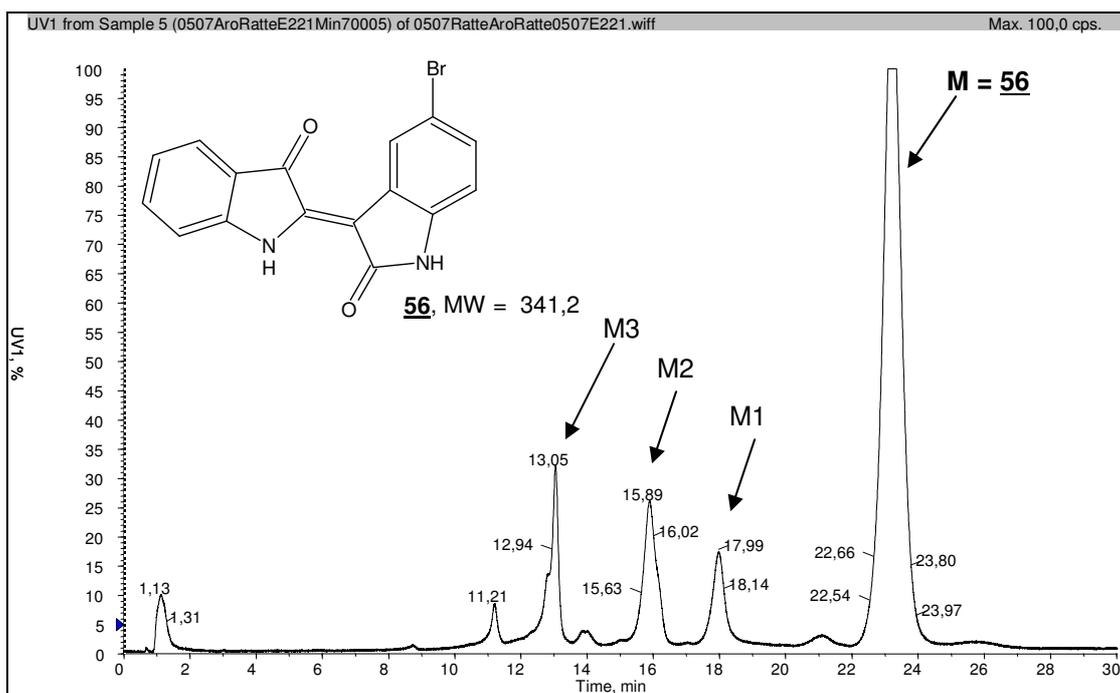


Abbildung 4.1.16: Inkubation von Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit **39**, UV-Chromatogramm. Inkubationsdauer: 70 min, Cytochrom P450 = 1,09 nmol/mg Protein

Für den UV-Peak **M3** zeigte das zugehörige Massenspektrum Hinweise auf eine Doppelhydroxylierung der Ausgangsverbindung. So konnte ein Doppelpic bei $m/z = 373,2$ und $375,2$ gefunden werden der um 2×16 amu im Vergleich zu **M0** erhöht ist (Anhang, Abbildung 12). (Tab. 4.1.8).

Tabelle 4.1.8: Übersicht der UV- und MS-Daten der Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen-Inkubation von **39**

Metabolit (Retentionszeit)	m/z	Zuordnung
M0 MS/MS-Exp.	343,2	$[M+H]^+$
	262,2	$[M+H-Br]^+$
	234,2	$[M+H-Br-HCO]^+$
	205,2	$[M+H-Br-2HCO]^+$
M (23,1 min)	341,1 + 343,2	$[M+H]^+$
	262,9	$[M+H-Br]^+$
	234,3	$[M+H-Br-HCO]^+$
	205,1	$[M+H-Br-2HCO]^+$
M1 (18,0 min)	Intensität der MS zu schwach	
M2 (15,9 min)		
M3 (13,1 min)	373,2 + 375,2	$[M3+H]^+ = [M+H+2 O]^+$ - Hinweis auf doppelte Hydroxylierung von M

4.1.2.3 *Metabolismus von Indirubin-3'-(2-hydroxyethyl)-oximether (10)*

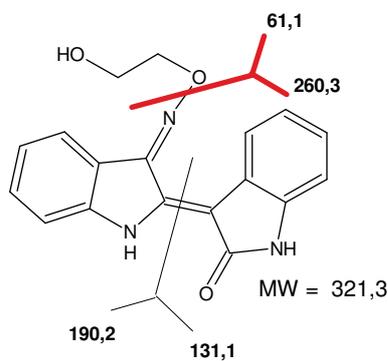


Abbildung 4.1.17: Verbindung **10** Hydroxyethers; s. Abb 4.1.17).

Indirubin-3'-(2-hydroxyethyl)oximether **10** zeigte im SRB-Test an LXFL529-Zellen einen IC_{50} -Wert von 1,5 μ M und von 2,3 μ M an MCF7-Zellen [Thommet, 2001]. Oxim-Derivate des Indirubins bilden eine charakteristische Fragmentierung im Massenspektrum. Man erkennt eine Spaltung der Sauerstoff-Stickstoff-Bindung der Oxim-Funktion (hier **10**: Abspaltung des

Die Untersuchungen zum Metabolismus von **10** wurde an Rinder-, Schweine, und Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen durchgeführt. Es zeigt sich, dass alle drei Lebermikrosomen-Arten das Indirubinoxim-Derivat **10** in die gleichen Metaboliten umwandelt, wobei die Umsatzrate von Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen über Rinder- und Schweinelebermikrosomen abnimmt.

Ausgangsbasis zur Identifizierung der Metaboliten dient ein MS/MS-Spektrum der unmetabolisierten Ausgangsverbindung **10** (s. Anhang, Abb. 13) aus dem die charakteristischen Fragmente für die Oxim-Verbindung hervorgehen. Die Fragmente sind in Tabelle 4.1.9 unter M0 dargestellt und erläutert.

Die Inkubation des Oxim-Derivates **10** mit Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen nach den unter Kapitel 4.1.2 beschriebenen Bedingungen liefert das in Abbildung 4.1.18 dargestellte UV-Chromatogramm. Man erkennt bei einer Retentionszeit von 12,1 Minuten (intensivster Peak) die nichtmetabolisierte Ausgangsverbindung **10** sowie bei 10,5 Minuten einen intensiven UV-Peak M1, wobei sich zusätzlich noch ein weiterer Peak bei 10,1 Minuten abzeichnet, M2. Im Fronting dieses Peaks sind noch weitere Peaks bei früheren Retentionszeiten erkennbar, auf die auf Grund ihrer schlechten Trennung sowie geringer Menge nicht weiter eingegangen wird. In den UV-Chromatogrammen von Rinder- und Schweinelebermikrosomen sind nur die beiden Peaks M1 und M2 zu beobachten.

Aus den zu den UV-Peaks zugehörigen Massenspektren geht hervor, dass es sich bei dem UV-Peak M (RT = 12,1 min), um die Ausgangsverbindung handelt (Anhang, Abb. 14). Man findet zwei schwache Peaks für den Molekülpeak mit angelagertem H-Atom, $[M+H]^+ = 322,2$ amu, sowie mit angelagerten Natriumion $[M+Na]^+ = 344,1$ amu. Ebenso charakteristisch sowie intensiv, tritt das für Oxime charakteristische Fragment bei $m/z = 260$ amu hervor, das durch die Spaltung der Sauerstoff-Stickstoff-Bindung der Oxim-Funktion entsteht.

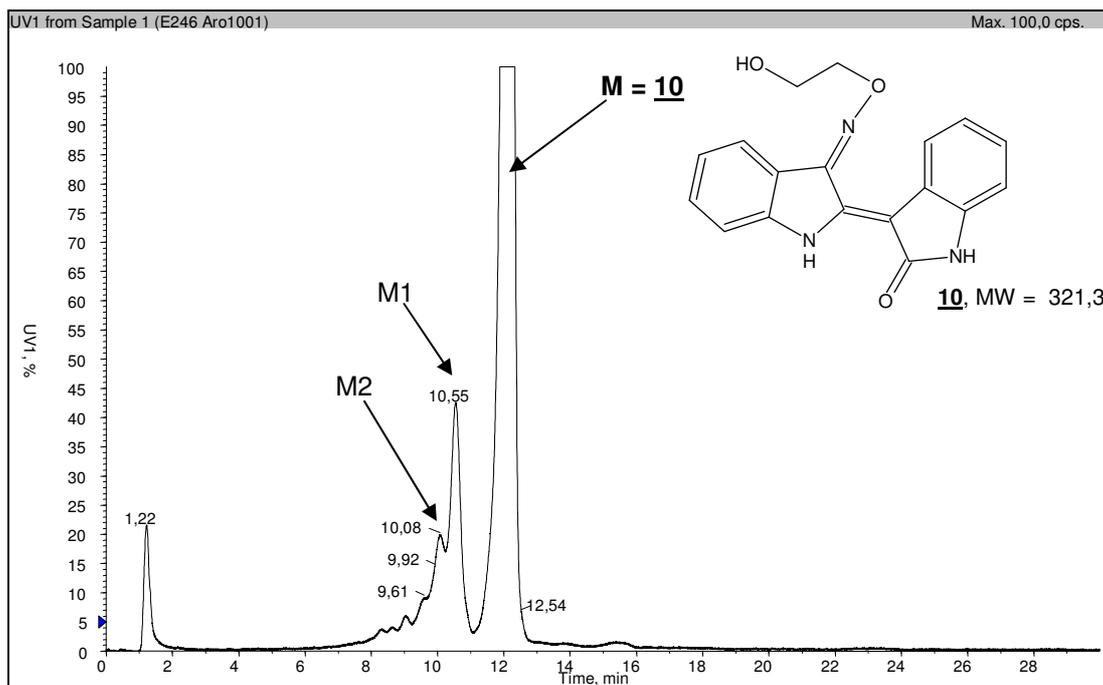


Abbildung 4.1.18: Inkubation von Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit **10**, UV-Chromatogramm. Inkubationsdauer: 1h, Cytochrom P450 = 1,78 nmol/mg Protein

Aus dem zum **Metabolitenpeak M1** (UV-Peak, RT = 10,5 min) zugehörigen Massenspektrum (Anhang, Abb. 15) ist deutlich eine Massenzunahme von 16 amu für sämtliche für M gefundene Fragmente zu beobachten. Die Zuordnung der Fragmente ist in Tabelle 4.1.9 dargestellt. Die Erhöhung der Masse um 16 amu lässt vermuten, dass durch die Umsetzung mit Rattenlebermikrosomen eine Hydroxylierung stattgefunden hat. Auf Grund der Tatsache, dass die Masse des Indirubin-Grundgerüsts nach Abspaltung der Hydroxyethylether-Seitenkette um 16 amu erhöht wurde und somit das charakteristische Fragment der Oxime um 16 amu auf 276,2 amu vergrößert wurde, ist zu vermuten, dass die Hydroxylierung an einem der beiden aromatischen Ringe stattgefunden hat.

Das Massenspektrum zu dem **Metabolitenpeak M2** (UV-Peak, RT = 10,1 min; Anhang, Abb. 16) zeigt im Vergleich zum vorherigen Massenspektrum M1, ein zusätzliches ausgeprägtes Signal bei $m/z = 292,2$. Die Masse, die durch Abspaltung der Hydroxyethylether-Seitenkette entsteht, beträgt für M = 260,2 amu, für M1 = 276,2 amu und nun für M2 = 292,2 amu. Dies lässt vermuten, dass nach einfacher Hydroxylierung zu M1 eine zweite Hydroxylierung zu M2 stattgefunden hat. Zusätzliche Peaks im Vergleich zu M1 treten noch bei $m/z = 354,1$ und $376,1$ auf. Es kann sich hierbei um den angenommenen Molekülpeak $[M_2+H]^+$ handeln, bei dem die Ausgangsverbindung doppelt am Ringsystem hydroxyliert wurde. Die Masse des hier beobachteten Molekülions ist um 32 amu zur Ausgangsverbindung und 16 amu zu M1 erhöht. Die Hydroxylierung der Seitenkette wird ausgeschlossen, da sonst nicht die Masse des charakteristischen Fragmentations der Oxime $m/z = 260$ ebenfalls um 16 bzw. 32 amu erhöht

worden wäre. Auf Grund der Coelution von M1 und M2 ist eine weitere klare Zuordnung der Signale im Massenspektrum nicht möglich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in allen drei Mikrosomen-Arten die gleichen Metaboliten generiert wurden (s. Tab. 4.1.9). Metabolit M1 ist vermutlich durch Hydroxylierung am aromatischen System des Indirubin-Grundgerüsts entstanden. Ausgehend von dieser Verbindung entsteht vermutlich Metabolit M2 als Sekundärmetabolit. Es handelt sich hierbei vermutlich um die Dihydroxyverbindung (vgl. Tab 4.1.9).

Über die genaue Position der Hydroxy-Gruppen kann auf Grund der MS-Spektren keine Aussage gemacht werden.

Tabelle 4.1.9: Übersicht der UV- und MS-Daten der Lebermikrosomen-Inkubation von **10**

Metabolit (Retentionszeit)	<i>m/z</i>	Zuordnung
M0 MS/MS-Exp.	322,2	[M+H] ⁺
	260,0	[M-HOCH ₂ -CH ₂ O] ⁺ = „Spaltung von Oxim NO-Bindung“
	233,2	[M-HOCH ₂ -CH ₂ O-NCH] ⁺
	205,0	[M-HOCH ₂ -CH ₂ O-NCH-CO] ⁺
M (12,12 min)	344,2	[M+Na] ⁺
	322,1	[M+H] ⁺
	260,2	[M-HOCH ₂ -CH ₂ O] ⁺ = „Spaltung von Oxim NO-Bindung“
	233,2	[M-HOCH ₂ -CH ₂ O-NCH] ⁺
	205,2	[M-HOCH ₂ -CH ₂ O-NCH-CO] ⁺
M1 ^{a)b)c)} (10,55 min)	360,0	[M1+Na] ⁺ = [M+O+Na] ⁺
	338,1	[M1+H] ⁺ = [M+OH] ⁺ = „Hydroxylierung von M“
	276,2	[M1- HOCH ₂ -CH ₂ O] ⁺ = [M+OH-HOCH ₂ -CH ₂ O] ⁺ = „Spaltung von Oxim NO-Bindung“ - Abspaltung der unveränderten Seitenkette“ ⇒ „ Monohydroxylierung am aromatischen System von M “
	260,2	[M1- HOCH ₂ -CH ₂ O-OH] ⁺ = [M-HOCH ₂ -CH ₂ O] ⁺
	249,3	[M1-HOCH ₂ -CH ₂ O-NCH] ⁺ = [M+OH-HOCH ₂ -CH ₂ O-NCH] ⁺
	221,0	[M1-HOCH ₂ -CH ₂ O-NCH-CO] ⁺ = [M+OH-HOCH ₂ -CH ₂ O-NCH-CO] ⁺
M2 ^{a)b)c)} (10,08 min)	376,2	[M2+Na] ⁺ = [M+2O+Na] ⁺
	354,3	[M2+H] ⁺ = [M+2OH] ⁺ = „Hydroxylierung von M1“
	292,3	[M2-HOCH ₂ -CH ₂ O] ⁺ = [M+2OH-HOCH ₂ -CH ₂ O] ⁺ = „Abspaltung der unveränderten Seitenkette“ ⇒ „ Dihydroxylierung am aromatischen System von M “

Generiert in: ^{a)} Rinderlebermikrosomen
^{b)} Schweinelebermikrosomen
^{c)} Aroclor-induzierte Rattenlebermikrosomen

4.1.2.4 *Metabolismus von glycosidischen Indirubin-Derivaten*

Glycosidische Indirubin-Derivate zeigen verbesserte Wasserlöslichkeit bei effektiver Hemmung des Tumorzellwachstums. Indirubin-3'-(2-β-D-glucopyranosylethyl)oximether **15** zeigt im SRB-Test an MCF7-Zellen einen IC₅₀-Wert von 1,2 μM, 5-Methylindirubin-3'-(2-β-D-glucopyranosylethyl)oximether **16** einen IC₅₀-Wert von 0,3 μM. Die Hemmung am isolierten Enzymkomplex CDK2/Cyclin E ist für alle drei getesteten Verbindungen (Abb. 4.1.19) in einem Bereich von IC₅₀ = 0,02-0,15 μM. Der Metabolismus der drei glycosidischen Indirubin-Derivaten (Abb. 4.1.19) wird im Folgenden, mittels Inkubationen mit Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen untersucht. Die Inkubationsbedingungen sind analog Kap. 4.1.2.

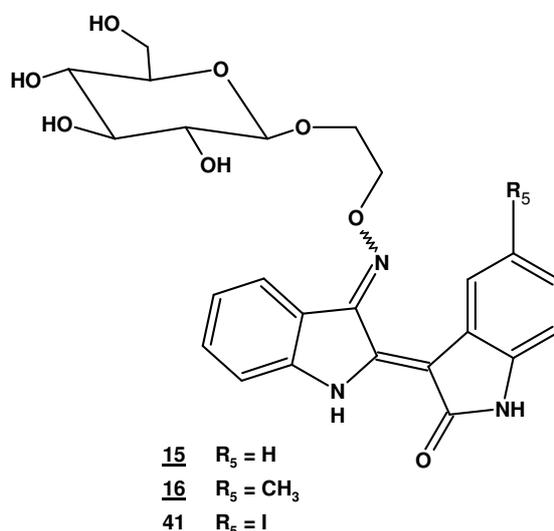


Abbildung 4.1.19: Strukturformel der getesteten Indirubin-3'-(2-β-D-glucopyranosylethyl)oximether-Derivate

4.1.2.4.1 **Metabolismus von Indirubin-3'-(2-β-D-glucopyranosylethyl)oximether (**15**)**

Indirubin-3'-(2-β-D-glucopyranosylethyl)oximether **15** zeigt nach einer Inkubationszeit von 70 Minuten das in Abbildung 4.1.20 abgebildete UV-Chromatogramm. Man erkennt als intensivsten Peak M bei einer Retentionszeit von 13,20 min die unveränderte Ausgangsverbindung **15** sowie im Fronting dieses Peaks drei zusätzliche Metabolitenpeaks, M1-M3. Eine Aussage über die Massenveränderungen zu den zu M-M3 zugehörigen Massenspektren erhält man durch Auswahl enger Zeitabschnitte zur Generierung der Massenspektren sowie durch Bildung von Differenzspektren.

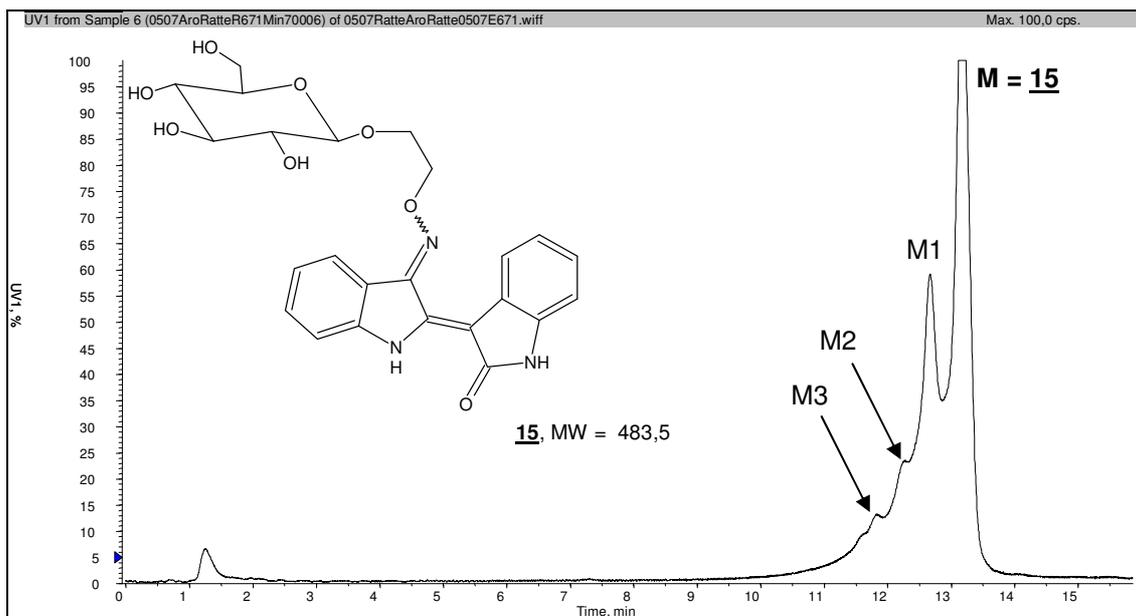


Abbildung 4.1.20: Inkubation von Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit **15**, UV-Chromatogramm. Inkubationsdauer: 70 min, Cytochrom P450 = 1,09 nmol/mg Protein

Das zum UV-Peak **M** zugehörige Massenspektrum ist im Anhang, Abbildung 18 dargestellt. Der protonierte Molekülpeak $[M+H]^+$ und sein zugehöriges Clusterion $[M+Na]^+$ sind als intensivster Peak bei $m/z = 484,6$, sowie bei $506,9$ deutlich erkennbar. Die Zuordnung der kleineren Fragmentationen erfolgt mit Hilfe des MS/MS-Spektrums der Reinsubstanz (s. Tab. 4.1.10 u. Anhang, Abb. 17). Der Peak bei $m/z = 322,4$ entsteht durch Spaltung der Bindung zwischen C1 des Zuckers und dem Sauerstoff-Atom der Ethylbrücke. Ein weiteres Fragment entsteht wie bereits bei dem Oxim-Derivat **10** (s. Kap. 4.1.2.3) durch Spaltung der Stickstoff-Sauerstoff-Bindung im Oxim. So entsteht das charakteristische Fragmentation bei $m/z = 260,4$. Spaltet dieses CO ab, gelangt man zu dem Fragmentation bei $m/z = 231,6$.

Aus dem zu UV-Peak **M1** zugehörigem Massenspektrum treten auf Grund der schlechten chromatographischen Trennung auch Massen auf, die zu dem Massenspektrum von **M** gehören. Zur besseren Unterscheidung der neuen Massenpeaks und bereits aus **M** bekannte Massenpeaks, werden beide Massenspektren übereinander dargestellt (s. Anhang, Abb. 19).

Die intensiven Peaks bei $m/z = 500,8$ und bei $522,9$ heben sich deutlich hervor. Da sich beide Peaks um eine Masse von 16 amu im Vergleich zu der Ausgangsverbindung (protoniertes Molekülion sowie Natriumcluster des Molekülpeaks) erhöht haben (Tab. 4.1.10), kann man davon ausgehen, dass die Ausgangsverbindung hydroxyliert wurde. Bei den beiden Peaks handelt es sich um den neuen protonierten Molekülpeak $[M1+H]^+$ und den Peak des Natrium-Clusters $[M1+Na]^+$. Zusätzlich neue Fragmentationen treten bei $m/z = 338$ und 276 auf. Sie können nur entstehen, wenn die wahrscheinliche Hydroxylierung am Indirubin-Grundgerüst stattgefunden hat. Sie entstehen nämlich wie bei **M** durch die Abspaltung des unveränderten

„Zuckers“ ($\Delta = -163$) sowie durch Spaltung der „Oxim“-Bindung. Die MS-Daten ergeben jedoch keinen weiteren Hinweis auf den Ort der Hydroxylierung.

Aus dem Massenspektrum zu UV-Peak **M2** sind keine neuen Daten im Vergleich zu M1 generierbar. Es handelt sich bei M2 möglicherweise um ein Strukturisomer gleicher Masse, wobei M2 polarer ist M1 was aus der früheren Retentionszeit von M1 hervorgeht.

Das Massenspektrum zu UV-Peak **M3**, (s. Tab. 4.1.10 u. Anhang, Abb. 20) enthält Massenpeaks, aus denen auf eine dreifache Hydroxylierung der Ausgangsverbindung zu schließen ist. Das schwache Signal bei $m/z = 554,7$ entspricht der Ausgangsmasse von M ($m/z = 483$) plus der Masse von drei Hydroxy-Gruppen plus der Masse eines Natrium-Atoms ($483+3*16+23$). Das entsprechende protonierte Molekülion bei $m/z = 532$ sowie andere Fragmentionen, die eine dreifache Hydroxylierung unterstützen würden, sind nicht nachweisbar.

Die Signale, die Hinweise auf eine doppelte Hydroxylierung geben, sind vielfältiger. Der Peak bei $m/z = 538,5$ könnte dem Natrium-Cluster der doppelt hydroxylierten Ausgangsverbindung ($483+2*16+23=538$) und der Peak bei $m/z = 516,4$ dem zugehörigen protonierten Molekülpeak ($483+2*16+1=516$) entsprechen. Weiterhin tritt ein Fragmention auf, das durch Spaltung der Bindung zwischen C-1 des Zuckers und dem Sauerstoff-Atoms der Ethylbrücke ($m/z = 354,8$) entsteht. Ein weiteres Fragmention entsteht durch Spaltung der N-O-Bindung der Oxim-Gruppe ($m/z = 292,4$). Beide Fragmentionen sind im Vergleich zur Ausgangsverbindung um 32 amu erhöht, was indikativ für eine doppelte Hydroxylierung der Ausgangsverbindung spricht (vgl. 4.2.4). Über die genaue Position der Hydroxy-Gruppen kann auf Grund der MS-Spektren keine Aussage gemacht werden.

Tabelle 4.1.10: Übersicht der UV- und MS-Daten der Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen-Inkubation von **15**

Metabolit (Retentionszeit)	m/z	Zuordnung
M0 MS/MS-Exp.	506,9	$[M+Na]^+$
	484,2	$[M+H]^+$
	322,2	$[M+2H - C_6H_{11}O_5]^+$
	260,2	$[M+H - C_6H_{11}O_5 - O(CH_2)_2OH]^+$
	232,0	$[M+H - C_6H_{11}O_5 - O(CH_2)_2OH - CO]^+$
	205,2	$[M+H - C_6H_{11}O_5 - O(CH_2)_2OH - 2CO]^+$
M (13,20 min)	506,9	$[M+Na]^+$

	484,6 322,4 260,4 231,6 205,3	$[M+H]^+$ $[M+2H - C_6H_{11}O_5]^+$ $[M+H - C_6H_{11}O_5-O(CH_2)_2OH]^+$ $[M+H - C_6H_{11}O_5-O(CH_2)_2OH-CO]^+$ $[M+H - C_6H_{11}O_5-O(CH_2)_2OH-2CO]^+$	
M1 (12,6 min)	522,9 500,8 338,8 276,4	$[M1+Na]^+ = [M+O+Na]^+$ $[M1+H]^+ = [M+O+H]^+$ $[M1+2H - C_6H_{11}O_5]^+$ $[M1+H - C_6H_{11}O_5-O(CH_2)_2OH]^+$	Hinweis auf Mono- hydroxylierung von M
M2 (12,1 min)	Identisch zu M1	Strukturisomer zu M1	
M3 (11,8 min)	554,7 538,5 516,4 354,8 292,4	$[M3'+Na]^+ = [M+3O+Na]^+$ $[M3''+Na]^+ = [M+2O+Na]^+$ $[M3''+H]^+ = [M+2O+H]^+$ $[M3''+2H+2 O - C_6H_{11}O_5]^+$ $[M3''+H - C_6H_{11}O_5-O(CH_2)_2OH]^+$	Hinweis auf Trihydroxylierung Hinweis auf Dihydroxylierung von M

4.1.2.4.2 Metabolismus von 5-Iodindirubin-3'-(2- β -D-glucopyranosylethyl)-oximether (**41**)

Im UV-Chromatogramm der Inkubation der Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit der 5-Iod-Indirubin-Verbindung **41**, Abbildung 4.1.21, sind neben den 3 Metabolitenpeaks M1-M3 und dem Peak M der Ausgangsverbindung noch ein zusätzlicher Peak X bei späterer Retentionszeit als von M erkennbar. Dieser Peak, der auf Grund der späteren Retentionszeit, unpolarer als die Ausgangsverbindung sein muss, tritt bei sämtlich durchgeführten Inkubationen (Kontrolle sowie Zeitkinetik) auf und scheint eine Verunreinigung der Ausgangssubstanz zu sein. In dem zugehörigem Massenspektrum sind keine substanzspezifischen Massen zu finden (s. Anhang, Abbildung 21).

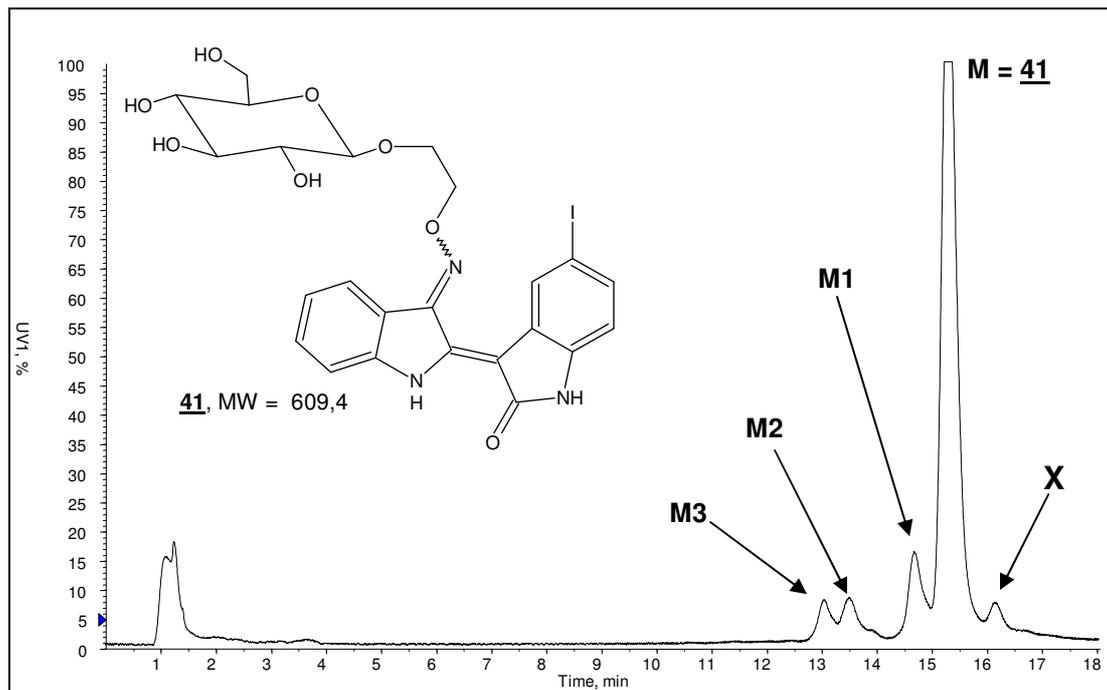


Abbildung 4.1.21: Inkubation von Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit **41**, UV-Chromatogramm. Inkubationsdauer: 45 min, Cytochrom P450 = 1,09 nmol/mg Protein

Im Massenspektrum zum UV-Peak **M** (s. Anhang, Abb. 23) erkennt man die für **41** charakteristischen Peaks, die durch ein MS/MS-Spektrum der Reinsubstanz bestimmt wurden (s. Tab. 4.1.11 u. Anhang, Abb. 22). So tritt der protonierte Molekülpeak bei $m/z = 610,6$ und das zugehörige Na-Addukt bei $m/z = 632,3$ auf. Zusätzlich sind die typischen Fragmentationen bei $m/z = 448,4$ und $386,8$ zu beobachten, die durch die charakteristische Abspaltung der Zucker-Spacer-Bindung, sowie durch Spaltung der N-O-Bindung der Oxim-Gruppe entstehen. Des Weiteren ist das Fragmentation mit der Masse 260,5 amu durch Iod-Abspaltung zu erklären.

Das Massenspektrum zum UV-Peak **M1** (s. Anhang, Abb. 24) lässt den Schluss zu, dass eine Hydroxylierung der Ausgangsverbindung am Indirubin-Grundgerüst stattgefunden hat. Sämtliche zuvor für **M** beschriebenen Fragmente wurden um 16 amu erhöht (s. Tab. 4.1.11). Eine zusätzliche, d.h. doppelte Hydroxylierung der Ausgangssubstanz **41** ist in den Massenspektren der UV-Peaks **M2/M3** zu erkennen. Da ihre Massenspektren identisch sind, aber sie unterschiedliche Retentionszeiten im UV-Chromatogramm besitzen, handelt es sich bei beiden Metaboliten um Strukturisomere mit gleicher Masse unterschiedlicher Polarität. Als Beispiel ist das Massenspektrum des UV-Peaks **M2** der 45 minütigen Inkubation im Anhang, Abbildung 25 dargestellt. Sämtliche Peaks die im Massenspektrum des UV-Peaks **M1** um 16 amu erhöht wurden, sind im Massenspektrum des UV-Peaks **M2** nochmals zusätzlich um 16 amu erhöht (s. Tab. 4.1.11). Dies weist auf eine doppelte Hydroxylierung

der Ausgangssubstanz hin, wohingegen unklar bleibt wo die Hydroxylierungen am Indirubin-Grundgerüst stattgefunden haben.

Tabelle 4.1.11: Übersicht der UV- und MS-Daten der Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen-Inkubation von **41**

Metabolit (Retentionszeit)	<i>m/z</i>	Zuordnung
M0 MS/MS-Exp.	610,1	[M+H] ⁺
	447,8	[M+2H- C ₆ H ₁₁ O ₅] ⁺
	386,1	[M+H - C ₆ H ₁₁ O ₅ -O(CH ₂) ₂ OH] ⁺
	260,3	[M+H - C ₆ H ₁₁ O ₅ -O(CH ₂) ₂ OH-I] ⁺
M (15,5 min)	632,3	[M+Na] ⁺
	610,6	[M+H] ⁺
	448,4	[M+2H- C ₆ H ₁₁ O ₅] ⁺
	386,8	[M+H - C ₆ H ₁₁ O ₅ -O(CH ₂) ₂ OH] ⁺
	260,5	[M+H - C ₆ H ₁₁ O ₅ -O(CH ₂) ₂ OH-I] ⁺
M1 (14,8 min)	648,2	[M1+Na] ⁺ = [M+O+Na] ⁺
	626,4	[M1+H] ⁺ = [M+O+H] ⁺
	464,3	[M1+2H- C ₆ H ₁₁ O ₅] ⁺
	402,5	[M1+H - C ₆ H ₁₁ O ₅ -O(CH ₂) ₂ OH] ⁺
	275,4	[M1+H - C ₆ H ₁₁ O ₅ -O(CH ₂) ₂ OH-I] ⁺
		Hinweis auf Mono- hydroxylierung von M
M2 (13,6 min)	664,5	[M2+Na] ⁺ = [M+2O+Na] ⁺
	642,4	[M2+H] ⁺ = [M+2O+H] ⁺
	480,5	[M2+2H- C ₆ H ₁₁ O ₅] ⁺
	418,2	[M2+H - C ₆ H ₁₁ O ₅ -O(CH ₂) ₂ OH] ⁺
	292,4	[M1+H - C ₆ H ₁₁ O ₅ -O(CH ₂) ₂ OH-I] ⁺
		Hinweis auf Di- hydroxylierung von M
M3 (13,3 min)	Identisch zu M2	Strukturisomer zu M2

4.1.2.4.3 Metabolismus von 5-Methylindirubin-3'-(2-β-D-glucopyranosyl-ethyl)oximether (**16**)

Auch hier werden zuerst die für Verbindung **16** charakteristischen Fragmentionen durch ein MS/MS-Spektrum der Reinsubstanz ermittelt (s. M0, Tab. 4.1.12 u. Anhang, Abb. 26). Aus dem UV-Chromatogramm (Abb. 4.1.22), der durchgeführten Inkubation mit Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen erkennt man bei einer Retentionszeit von 13,8 Minuten die Ausgangsverbindung M und drei zusätzliche Peaks M1 bis M3 bei früheren Zeiten. Die zu den Peaks gehörenden Massenspektren werden, wie in Kapitel 4.2.4.1 beschrieben, durch Überlagerungsspektren interpretiert.

Aus dem zu UV-Peak **M** gehörendem Massenspektrum (s. Anhang, Abb. 27) geht eindeutig hervor, dass es sich um die Ausgangsverbindung **16** handelt. So findet man für **16** den

protonierte Molekülpeak $[M+H]^+$ als intensivster Peak bei $m/z = 498,4$ und der Peak des Clusterions $[M+Na]^+$ bei $m/z = 520,6$. Zusätzlich treten bei $m/z = 336,2$ und $274,4$ die typischen Fragmentationen auf, die durch die charakteristische Abspaltung der Zucker-Spacer-Bindung, sowie durch Spaltung der N-O-Bindung der Oxim-Gruppe entstehen. Ein weiteres Fragmentation bei $m/z = 260,7$ entsteht durch eine zusätzliche Abspaltung der Methyl-Gruppe (s. Tab. 4.1.12).

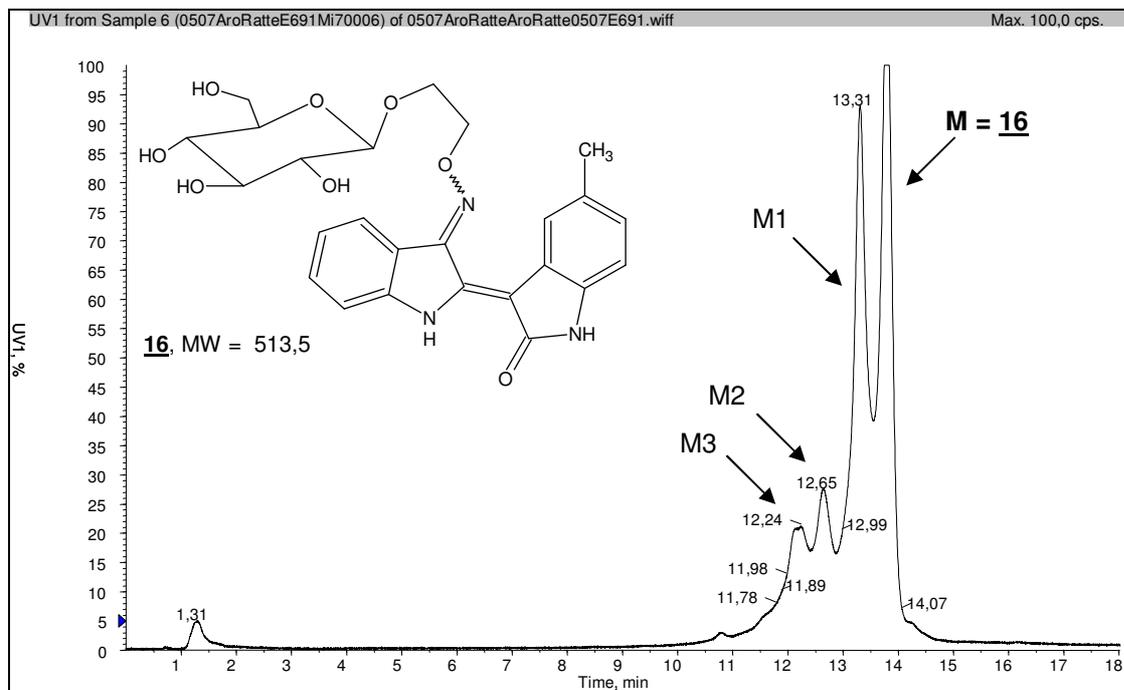


Abbildung 4.1.22 : Inkubation von Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit **16**, UV-Chromatogramm. Inkubationsdauer: 45 min, Cytochrom P450 = 1,09 nmol/mg Protein

Die Massenspektren der UV-Peaks **M1** und **M2** sind identisch. Da die beiden Verbindungen jedoch zu unterschiedlichen Retentionszeiten eluieren, muss es sich um Strukturisomere handeln. Stellvertreten für **M1** und **M2** ist im Anhang, Abbildung 28 das Massenspektrum des UV-Peaks **M1** der 70 minütigen Inkubation dargestellt. Sämtliche neue Signale sind um 16 amu zu den vergleichbaren Signalen der Ausgangsverbindung erhöht (s. Tab. 4.1.12) und lassen sich durch eine wahrscheinliche Monohydroxylierung des Grundgerüsts erklären. Man erkennt ebenfalls ein Fragmentation ($m/z = 276,1$), das durch Abspaltung einer Methyl-Gruppe entsteht. Dieses Signal ist analog der Interpretation des Massenspektrums von 5-Methylindirubin **6** ein Hinweis dafür, dass die Methyl-Gruppe metabolisch nicht verändert wurde und die Hydroxylierung am Grundgerüst stattgefunden hat (vgl. Kap. 4.1.2).

Aus dem Massenspektrum zu UV-Peak **M3** der 70 minütigen Inkubation (s. Anhang, Abb. 29) geht hervor, dass vermutlich eine doppelte Hydroxylierung am Indirubin-Grundgerüst stattgefunden hat. Sämtliche Signale, die bei dem Massenspektrum zu **M1** diskutiert wurden, sind für **M3** nochmals um 16 amu erhöht. Auch hier lässt sich die Abspaltung eines

Fragmentes mit der Masse von 15 amu beobachten, so dass die zweite Hydroxylierung ebenfalls am Grundgerüst des Indirubins stattgefunden haben muss (s. Tab. 4.1.12).

Tabelle 4.1.12: Übersicht der UV- und MS-Daten der Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen-Inkubation von **16**

Metabolit (Retentionszeit)	<i>m/z</i>	Zuordnung
M0 MS/MS-Exp.	498,2	[M+H] ⁺
	336,1	[M+2H- C ₆ H ₁₁ O ₅] ⁺
	274,7	[M+H - C ₆ H ₁₁ O ₅ -O(CH ₂) ₂ OH] ⁺
	260,2	[M+H - C ₆ H ₁₁ O ₅ -O(CH ₂) ₂ OH-Me] ⁺
M (13,8 min)	502,6	[M+Na] ⁺
	498,4	[M+H] ⁺
	336,2	[M+2H- C ₆ H ₁₁ O ₅] ⁺
	274,7	[M+H - C ₆ H ₁₁ O ₅ -O(CH ₂) ₂ OH] ⁺
	260,7	[M+H - C ₆ H ₁₁ O ₅ -O(CH ₂) ₂ OH-Me] ⁺
M1 (13,3 min)	536,7	[M1+Na] ⁺ = [M+O+Na] ⁺
	514,4	[M1+H] ⁺ = [M+O+H] ⁺
	352,3	[M1+2H- C ₆ H ₁₁ O ₅] ⁺
	290,7	[M1+H - C ₆ H ₁₁ O ₅ -O(CH ₂) ₂ OH] ⁺
	276,1	[M1+H - C ₆ H ₁₁ O ₅ -O(CH ₂) ₂ OH-Me] ⁺
M2 (12,6 min)	Identisch zu M1	Strukturisomer zu M1
M3 (12,2 min)	552,8	[M2+Na] ⁺ = [M+2O+Na] ⁺
	530,7	[M1+H] ⁺ = [M+2O+H] ⁺
	368,4	[M1+2H- C ₆ H ₁₁ O ₅] ⁺
	306,1	[M1+H - C ₆ H ₁₁ O ₅ -O(CH ₂) ₂ OH] ⁺
	291,1	[M1+H - C ₆ H ₁₁ O ₅ -O(CH ₂) ₂ OH-Me] ⁺

Hinweis auf Mono-
hydroxylierung
von M

Hinweis auf Di-
hydroxylierung
von M

4.1.2.5 Abschätzung der relativen Umsatzgeschwindigkeit ausgewählter Indirubin-Derivate

Für die unten abgebildeten Indirubin-Derivate wurden jeweils Inkubationen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten (10, 20, 30, 45 und 70 Minuten) mit gleichen Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen unter identischen Inkubationsbedingungen durchgeführt. Somit ist sichergestellt, dass in sämtlichen Ansätzen eine gleiche CYP 450-Isoenzymverteilung und ein identischer CYP-450-Gesamtgehalt vorliegt (vgl. Kap 4.1.1.1.1, Ratte Aroclor-induziert III). Um eine erste Abstufung der getesteten Indirubin-Derivate in Bezug auf ihre unterschiedlichen Umsatzgeschwindigkeiten in den durchgeführten Inkubationsversuchen zu erhalten, ist in Abbildung 4.1.23 die zeitliche Abnahme der Konzentration der unmetabolisierten Verbindungen im Inkubationsansatz dargestellt, die mittels HPLC/UV bestimmt wurde.

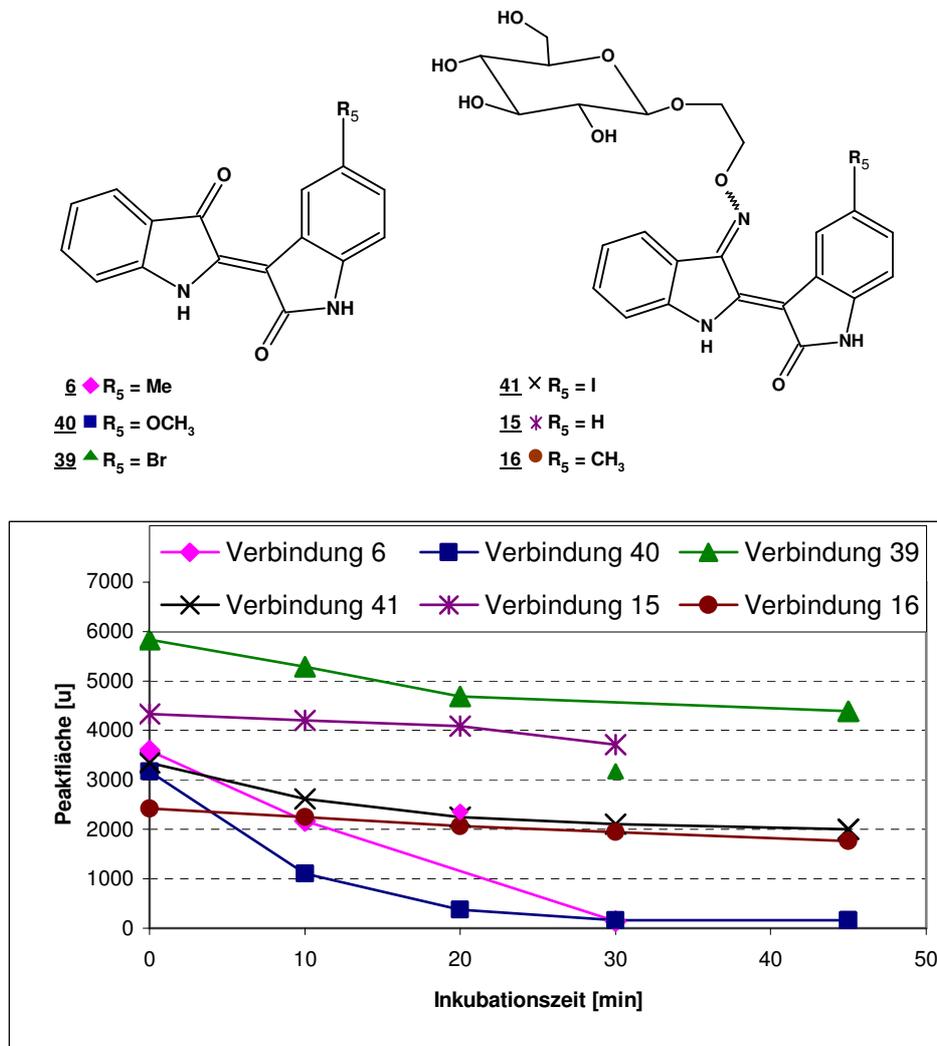


Abbildung 4.1.23: Abnahme der Konzentration der unmetabolisierten Verbindung in Abhängigkeit der Inkubationszeit. Als Maß für die Konzentration dient die Fläche des HPLC/UV- Peaks.

Aus Abbildung 4.1.23 geht hervor, dass die nicht-glycosidischen Indirubin-Derivate (**6**, **40**, **39**) im Vergleich zu den glycosidischen Indirubin-3'-oximether-Derivate **41**, **15**, **16** eine stärkere Abnahme der Konzentration der Ausgangsverbindung zeigen. Hieraus lässt sich schließen, dass der glycosidische Oximether in Position 3' sich negativ auf die Umsetzung mit CYP 450 Isoenzymen auswirkt.

Von den nicht-glycosidischen Indirubin-Derivaten werden 5-Methylindirubin **6** und 5-Methoxyindirubin **40** am schnellsten in den durchgeführten Inkubationen umgesetzt. Dies könnte bedeuten, dass geeignete Substituenten in Position 5, die die Elektronendichte im aromatischen System erhöhen, einen positiven Effekt auf die Umsetzung mit CYP 450 Isoenzymen besitzen. Dieser Effekt ist jedoch nicht für die glycosidischen Indirubin-3'-oximether-Derivate **41**, **15**, **16** zu beobachten.

Es handelt sich bei diesen Daten um eine erste Abschätzung der Umsatzgeschwindigkeit die weitere Untersuchung bedürfen. Die Umsatzgeschwindigkeit nimmt in folgender Reihenfolge ab:

- 5-Methylindirubin **6** > 5-Methoxyindirubin **40** >> 5-Bromindirubin **39**
- > 5-Iodindirubin-3'-(2-β-D-glucopyranosylethyl)oximether **41**
- > Indirubin-3'-(2-β-D-glucopyranosylethyl)oximether **15**
- > 5-Methylindirubin-3'-(2-β-D-glucopyranosylethyl)oximether **16**

4.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zum oxidativen *in vitro*-Metabolismus von ausgewählten Indirubin-Derivaten

Es wurden die in Abbildung 4.1.24 dargestellten Indirubin-Derivate auf ihren oxidativen *in vitro*-Metabolismus getestet. Hierzu wurden Inkubationen mit Lebermikrosomen, hauptsächlich Aroclor-induzierte Rattenlebermikrosomen durchgeführt.

Für sämtliche Verbindungen konnte die Bildung mehrerer Metaboliten nachgewiesen werden, wobei die zugehörigen MS-Daten Hinweise auf eine Mono- bzw. Dihydroxylierung der Ausgangsverbindung an den beiden aromatischen Ringsystemen des Indirubin-Grundgerüsts liefern. Eine genaue Zuordnung, an welcher Stelle die Hydroxylierung stattgefunden hat, ist

auf Grund der MS-Daten nicht möglich. Die Anzahl der gebildeten Metaboliten (M1 bis M5), sowie die zugehörige Veränderung der Ausgangsverbindung sind in Tabelle 4.1.13 dargestellt.

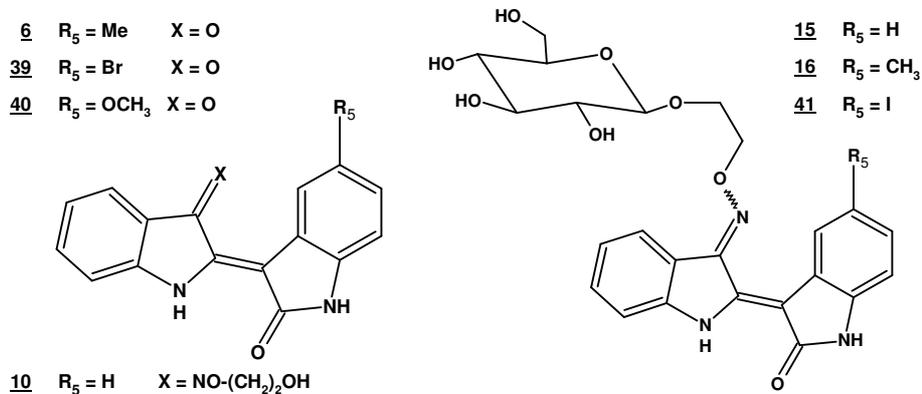


Abbildung 4.1.24: Getestete Indirubin-Derivate auf ihren *in vitro*-Metabolismus (Lebermikrosomen)

Tabelle 4.1.13: Entstandene Metaboliten der verschiedenen Indirubin-Derivate durch Lebermikrosomen-Inkubation; Δ: Angabe der Massenzunahme der Ausgangsverbindung [amu]

Nr	M1	M2	M3	M4	M5
<u>6</u>	Δ=+16 MH ^{(a)(b)(d)}	Δ=+16 MH ^{(a)(b)(c)(d)}	Δ=+32 DH ^{(a)(b)(c)(d)}	?Aldehyd ^{(a)(b)(c)(d)}	?Carbonsäure ^(a)
<u>39</u>	Δ=+16 MH ^(d)	Δ=+16 MH ^(d)	Δ=+32 DH ^(d)		
<u>40</u>	?	?	Δ=+16 MH ^(d)		
<u>10</u>	Δ=+16 MH ^{(a)(b)(d)}	Δ=+32 DH ^{(a)(b)(d)}			
<u>24</u>	Δ=+16 MH ^(d)	Δ=+16 MH ^(d)	Δ=+32 DH ^(d)		
<u>41</u>	Δ=+16 MH ^(d)	Δ=+32 DH ^(d)	Δ=+32 DH ^(d)		
<u>16</u>	Δ=+16 MH ^(d)	Δ=+16 MH ^(d)	Δ=+32 DH ^(d)		

Generiert in: ^{a)} Rinderlebermikrosomen
^{b)} Schweinelebermikrosomen

^{c)} uninduzierten Rattenlebermikrosomen
^{d)} aroclorinduzierten Rattenlebermikrosomen

MH = mögliche Mono-Hydroxylierung

DH = mögliche Di-Hydroxylierung

Der mikrosomale Metabolismus von 5-Methylindirubin 6 wurde in verschiedenen tierischen Lebermikrosomen untersucht. Rinderlebermikrosomen generierten fünf Metaboliten. Vier von den fünf gefundenen Metaboliten konnten auch in den Inkubationen mit Schweinelebermikrosomen und Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen gefunden werden. Die Massenzunahmen deuten auf eine Oxidation hin, indem ein, bzw. zwei Sauerstoff-Atome an das Indirubin-Grundgerüst aufgenommen wurden.

4.2 Synthese: Herstellung der Metaboliten M2 (74) und M3 (75) von 5-Methylindirubin (6)

Ausgangspunkt für die Synthese der gefundenen Metaboliten M2 6-Hydroxy-5-methylindirubin 56 und M3 6,7'-Dihydroxy-5-methylindirubin 57 ist die von Russell und Kaupp, 1969 beschriebene Methode zur Herstellung von Indirubin-Derivaten. Mittels Kondensation von substituierten Derivaten des Indoxyl-3-acetats 42R mit substituierten Isatin-Derivaten 43R wird ein breites Spektrum an Indirubin-Derivaten erhalten (Abb. 4.2.1).

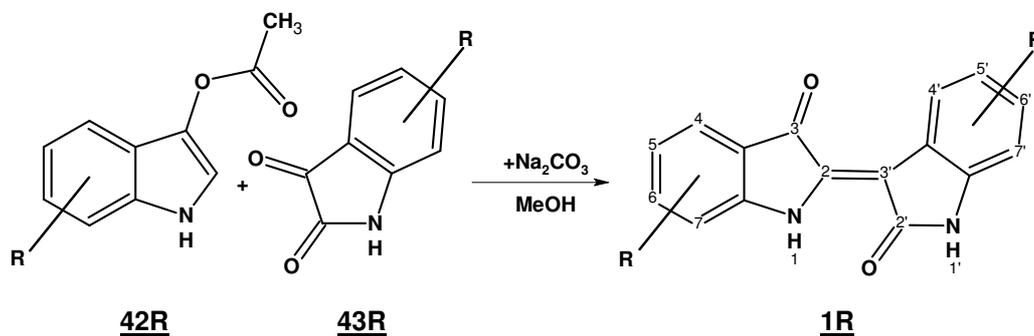


Abbildung 4.2.1: Allgemeine Herstellung von Indirubin-Derivaten nach Russell und Kaupp, 1969

Für die Herstellung der beiden Metaboliten (Metabolit 2, 6-Hydroxy-methylindirubin 74 und Metabolit 3, 6,7'-Dihydroxy-5-methylindirubin 75) muss man somit die geeigneten Indoxyl-3-acetat- und Isatin-Derivate zu den gesuchten Indirubin-Derivaten (Abb. 4.2.2) kondensieren.

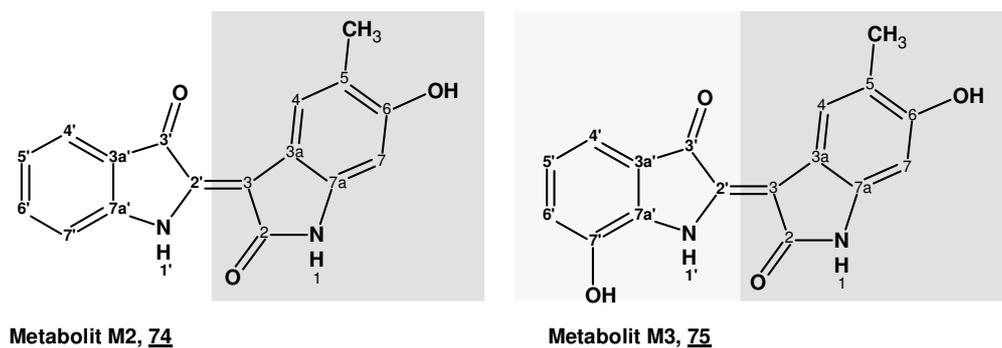


Abbildung 4.2.2: 6-Hydroxy-5-methylindirubin 74 und 6,7'-Dihydroxy-5-methylindirubin 75

Für die Synthese des ersten Metaboliten, dem 6-Hydroxy-5-methylindirubin 74 geht man von Indoxyl-3-acetat 42 und von 6-Hydroxy-5-methylisatin 76, einer bisher nicht beschriebener Verbindung aus (Abb. 4.2.3).

Zur Herstellung des zweiten Metaboliten, 6,7'-Dihydroxy-5-methyl-indirubin **75** benötigt man wiederum 6-Hydroxy-5-methyl-isatin **76**, sowie das ebenfalls noch nicht in der Literatur beschriebene 7-Hydroxy-indoxyl-3-acetat **77**.

In Abbildung 4.2.3 ist die Kondensation des 6-Hydroxy-5-methyl-isatins **76** mit der jeweiligen Indoxyl-3-acetat-Komponente zu 6-Hydroxy-5-methyl-indirubin **74** und 6,7'-Dihydroxy-5-methyl-indirubin **75** dargestellt.

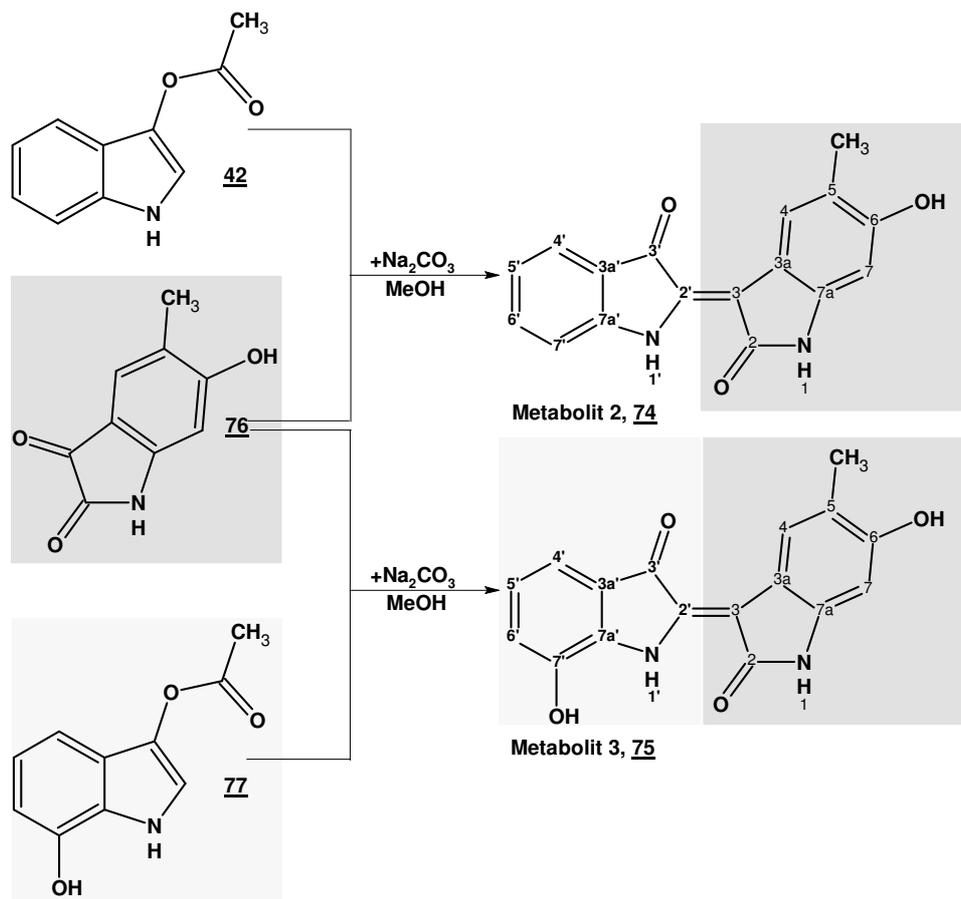


Abbildung 4.2.3: Herstellung von 6-Hydroxy-5-methyl-indirubin **74** sowie 6,7'-Dihydroxy-5-methyl-indirubin **75**

4.2.1 Metabolit M2: 6-Hydroxy-5-methyl-indirubin (74)

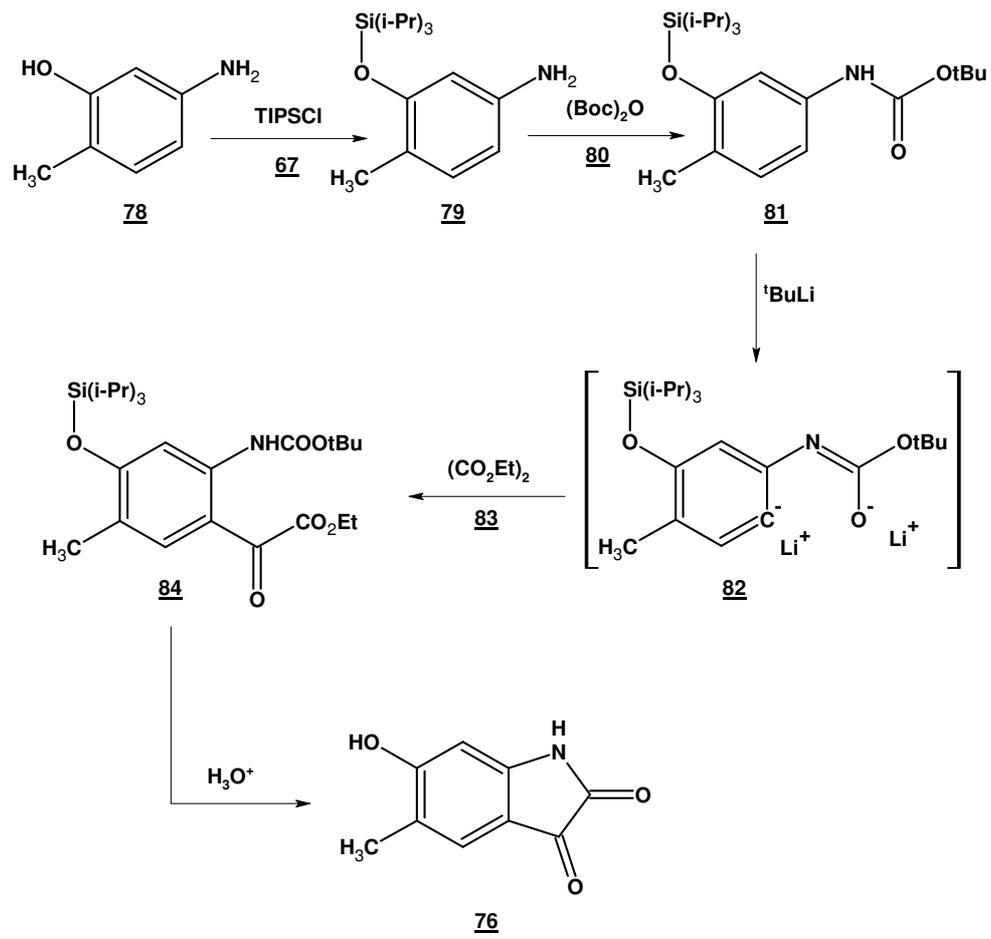
4.2.1.1 Synthesekonzept / Syntheseweg: 6-Hydroxy-5-methyl-isatin (76)

Zur Synthese von Isatinen (43R) geht man wie in Kapitel 2.5.1.1 beschrieben von den entsprechend substituierten Anilinen aus. Ausgangsverbindung für die hier benötigte Isatin-Verbindung 76 ist somit ein Anilin das in *meta*-Position eine Hydroxy- und in *para*-Position eine Methyl-Gruppe besitzt 78.

Die von Marvel und Hiers (1941) beschriebene Methode ist abgesehen von ihrem nicht-regioselektiven Verlauf und auf Grund der verwendeten Reaktionsbedingungen (konz. Schwefelsäure) nicht zur Synthese von Hydroxy-substituierten Isatinen geeignet.

Eine regioselektive Methode zur Herstellung von Isatinen stellt die von Hewawasam und Meanwell 1994 (s. Kap. 2.5.1.1) beschriebene Methode zur Herstellung funktionalisierter, regiospezifischer Isatinen aus Anilinen dar. Sie beruht auf der Eigenschaft, dass acylierte Aniline 59 auf eine Metallierung einen *ortho*-dirigierenden Effekt besitzen (s. Kap. 2.5.1.1 Abb. 2.20). [Fuhrer und Geschwend, 1979; Muchowski und Venuti, 1980]. Als Ausgangsverbindung zur Herstellung des acylierten Anilins dient 5-Amino-2-methyl-phenol 78, das mittels Triisopropylsilylchlorid (TIPSCl) umgesetzt wird (Abb. 4.2.4). Die so eingeführte Triisopropylsilyl-(TIPS)-Schutzgruppe der Hydroxy-Gruppe in Verbindung 79 verhindert, dass die anschließende Metallierung an der Hydroxy-Gruppe stattfindet, sowie blockiert die sperrige TIPS-Gruppe den Angriff von BuLi auf das benachbarte CH-Atom [Kondo et al., 1997]. In einem zweiten Reaktionsschritt wird an der Amin-Gruppe, die für die Lithiierung dirigierend wirkende Acyl-Gruppe 81 eingeführt. Als Acyl-Gruppe kommt nur die *N*-tert-Butyloxycarbonyl- oder die *N*-Pivaloyl-Gruppe in Frage (s. Kap. 2.5.1.1). Die *N*-tert-Butyloxycarbonyl(BOC)-Gruppe hat den Vorteil, dass sie leichter wieder zu entfernen ist. Die anschließende Umsetzung mit ^tBuLi ergibt das Di-Anion 82, das mittels Diethyloxalat 83 in den α -Keto-Substituent 84 überführt wird. In einem letzten Reaktionsschritt wird mittels Säure die Amino- sowie Hydroxy-Schutzgruppe entfernt und gleichzeitig der Ringschluss zum 6-Hydroxy-5-methyl-isatin 76 durchgeführt (Abb. 4.2.4).

Vorteil bei der verwendeten TIPS- und BOC-Schutzgruppe ist, dass sie im letzten Syntheseschritt, dem sauren Ringschluss, gleichzeitig entfernt werden.

Abbildung 4.2.4: Syntheschema zur Herstellung von 6-Hydroxy-5-methyl-isatin **76**

4.2.1.2 *Synthese der benötigten Ausgangsverbindungen zur Herstellung von 6-Hydroxy-5-methyl-isatin (76)*

4.2.1.2.1 **Herstellung von 4-Methyl-3-(triisopropylsilyloxy)-anilin (79)**

4.2.1.2.1.1 **Synthese und Mechanismus**

Zur Einführung der Schutzgruppe werden 5-Amino-2-methyl-phenol (**78**) und Imidazol in Pyridin mit Triisopropylsilylchlorid umgesetzt. Es handelt sich hierbei um eine basisch katalysierte nucleophile Substitution in einem aprotischen Lösungsmittel. Bei den verwendeten Reaktionsbedingungen, schwache Base, wurde sichergestellt, dass die Silylierung selektiv an der Hydroxy-Gruppe und nicht ebenfalls an der Amino-Gruppe stattfindet. Nach wässriger Aufarbeitung und Extraktion mittels Methylenchlorid beträgt die Ausbeute ohne weitere Aufreinigung 90 %.

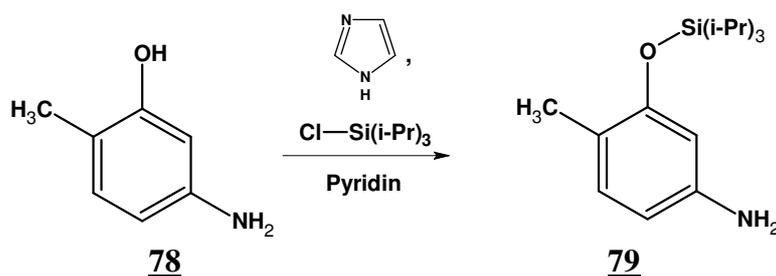


Abbildung 4.2.5: Herstellung von 4-Methyl-3-(triisopropylsilyloxy)-anilin **79**

Die Reinheit und Identität des 4-Methyl-3-(triisopropylsilyloxy)-anilin **79** wurde dünnschichtchromatographisch, ¹H- und ¹³C-NMR-spektroskopisch belegt. Hier soll stellvertretend nur auf die ¹³C-NMR-Daten eingegangen werden. Das ¹H-NMR ist im Anhang, Abbildung 30 dargestellt.

4.2.1.2.1.2 ^{13}C -NMR-Daten des 4-Methyl-3-(triisopropylsilyloxy)-anilins (**79**)

Die Konstitution von Verbindung **79** lässt sich aus den $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR Daten und aus dem ^{13}C -DEPT-NMR (Abb. 4.2.6) mit Hilfe der üblichen NMR-Literatur (Hesse, Maier, Zeeh, 1995) belegen.

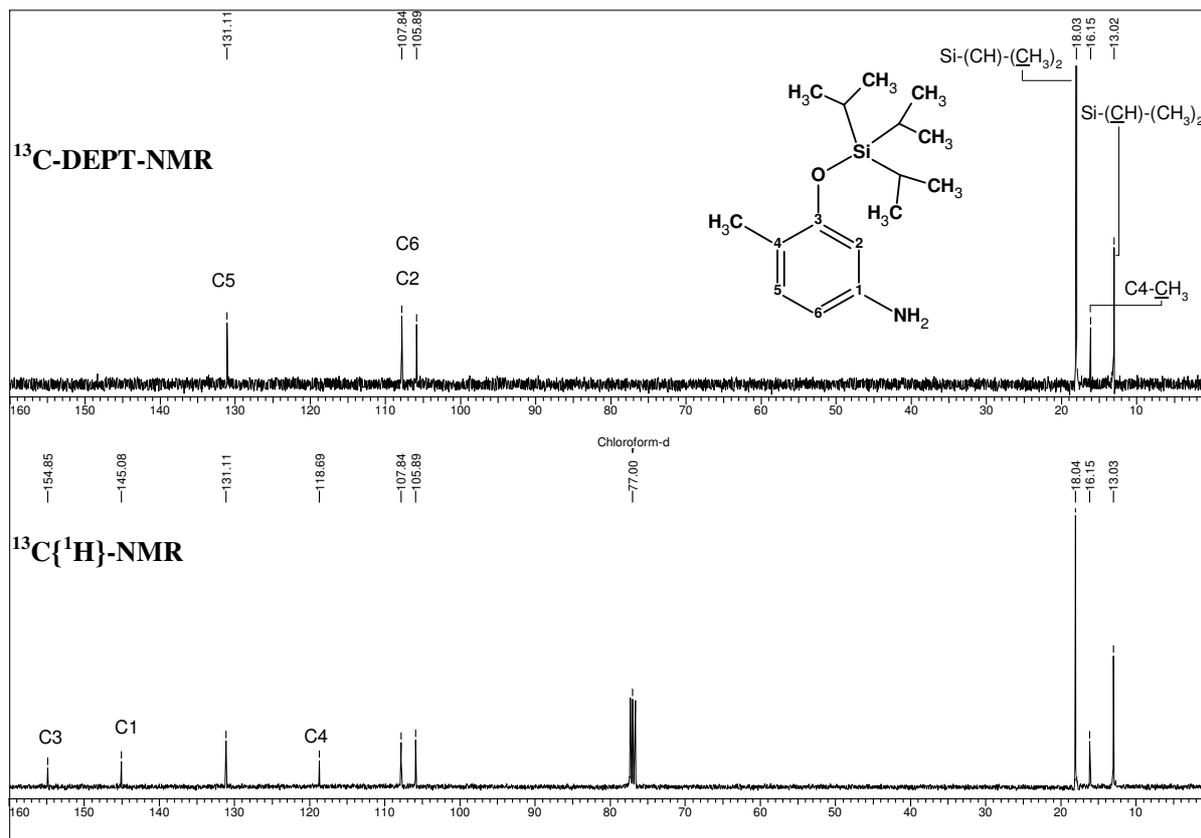


Abbildung 4.2.6: Vergleich des $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -Spektrum und ^{13}C -DEPT-Spektrum von 4-Methyl-3-(triisopropylsilyloxy)-anilin **79**. (CDCl_3 , $\delta = 77,00$ ppm)

Im $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum erkennt man im charakteristischen Bereich für aromatische C-Atome 6 Signale. Aus dem Vergleich mit dem ^{13}C -DEPT-NMR-Spektrum ergeben sich eindeutig drei Signale für nicht-substituierte aromatische C-Atome mit positiven Signalen und drei Signale für substituierte aromatische C-Atome, die im ^{13}C -DEPT-NMR nicht erkennbar sind. Von den substituierten aromatischen C-Atomen erfährt das Signal von C-3, durch die direkte Substitution mit dem Triisopropylsilyloxy-Substituenten, die stärkste Tieffeldverschiebung und tritt bei $\delta = 154,8$ ppm in Resonanz. Bei $\delta = 145,1$ ppm erscheint das Signal von C-1, das die Amino-Gruppe trägt sowie tritt das Signal von C-4, nach Inkrementberechnungen, am weitesten hochfeldverschoben bei $\delta = 118,7$ ppm in Resonanz.

Auf gleiche Art lassen sich die drei nicht-substituierten aromatischen C-Atome, die im ^{13}C -DEPT-NMR ein positives Signal ergeben, zuordnen. Am weitesten tieffeldverschoben tritt das Signal von C-5 in Resonanz ($\delta = 131,1$ ppm). Die beiden anderen Signale der aromatischen C-Atome erfahren, auf Grund ihrer *ortho*- / *para*- (für C-6) beziehungsweise *ortho*- / *ortho*-Stellung (für C-2) zu der Amino- und Triisopropylsilyloxy-Gruppe, eine Verschiebung zu höherem Feld und treten bei $\delta = 107,8$ ppm bzw. $\delta = 105,9$ ppm in Resonanz.

Das Signal bei 18 ppm wird den Methyl-Gruppen der Triisopropylschutzgruppe zugeordnet. Das Signal der Methin-Gruppe tritt bei $\delta = 13$ ppm in Resonanz und das Signal bei $\delta = 16,2$ ppm entspricht der Methylgruppe in Position 4.

4.2.1.2.2 Herstellung von tert-Butyl-(4-methyl-3-(triisopropyl-silyloxy)-phenyl)-carbammat (**81**)

4.2.1.2.2.1 Synthese und Mechanismus

Für die nachfolgende Metallierung wird 4-Methyl-3-(triisopropylsilyloxy)-anilin **79** mit Di-tert-butyldicarbonat **80** in Tetrahydrofuran umgesetzt. Bei dem Reaktionsmechanismus handelt es sich um eine klassische nucleophile Additions-Eliminierungs-Reaktion, die in Abbildung 4.2.7 beschrieben ist.

Die Ausbeute an tert-Butyl-(4-methyl-3-(triisopropylsilyloxy)-phenyl)-carbammat **81** betrug 81 %. Die Reinheit und Identität des tert-Butyl-(4-methyl-3-(triisopropylsilyloxy)-phenyl)-carbammat **81** wurde dünnschichtchromatographisch, ^1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopisch belegt. Das ^1H -NMR ist im Anhang, Abbildung 31 dargestellt.

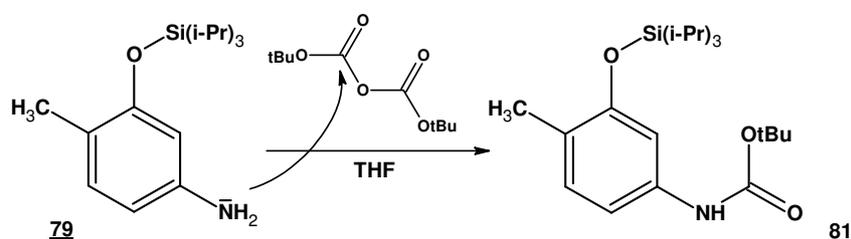


Abbildung 4.2.7: Herstellung von tert-Butyl-(4-methyl-3-(triisopropylsilyloxy)-phenyl)-carbammat **81**

4.2.1.2.2.2 ^{13}C -NMR-Daten des tert-Butyl-(4-methyl-3-(triisopropylsilyloxy)-phenyl)-carbammat (**81**)

Im $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR ergeben sich im Vergleich zu der Ausgangsverbindung **79** drei neue Signale. Bei tiefem Feld, $\delta = 154,4$ ppm, tritt das Signal des Carbonyl-C-Atoms der *tert*-Butoxycarbonyl-Schutzgruppe (BOC) als Singulett in Resonanz sowie treten bei $\delta = 80,1$ ppm ein Singulett und bei $\delta = 28,3$ ppm ein Quartett ($^1J_{\text{C,H}} = 127$ Hz) in Resonanz. Das Singulett entspricht dem Signal des quartären C-Atoms und das Quartett dem Signal der Methyl-C-Atomen der *tert*-Butoxycarbonyl (BOC)-Gruppe.

In Abbildung 4.2.8 ist das entkoppelte $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR mit dem gekoppelten ^{13}C -NMR überlagert dargestellt. Eindeutig erkennbar sind die drei Signale der aromatischen nicht substituierten C-Atome C-2, C-5 und C-6, die im ^{13}C -NMR je ein Dublett ergeben. Die Kopplungskonstanten liegen im Bereich von 158 bis 162 Hz. Die Einführung der Schutzgruppe der Amino-Funktion zu den in *ortho*-Position stehenden C-Atomen C-2 und C-6 bewirkt eine leichte Tieffeldverschiebung der Signale von $\Delta = + 2,8$ ppm für C-2, beziehungsweise $\Delta = + 3$ ppm für C-6. Für das Signal von C-5 ist keine Verschiebung erkennbar.

Eine deutlichere Verschiebung ist bei den Resonanzen der drei aromatischen substituierten C-Atomen festzustellen. Die stärkste Verschiebung ist für das Signal von C-1 zu erkennen. Es erfährt durch die Einführung der Schutzgruppe eine Hochfeldverschiebung von $\Delta = - 8,2$ ppm. Das Signal von C-3, in *meta*-Position zur Schutzgruppe, erfährt nur eine leichte Verschiebung zu höherem Feld ($\Delta = -2,3$ ppm) und das Signal des in *para*-Position zur Schutzgruppe stehende C-4 erhält einen leichten Tieffeldshift von $\Delta = + 4,5$ ppm.

Die restlichen Signale, verglichen mit der Ausgangsverbindung **79**, erfahren keine Veränderung. Das Signal der Methylgruppe in Position 4 tritt unverändert bei $\delta = 16,4$ ppm in Resonanz und die Signale der C-Atome der Triisopropylschutzgruppe treten unverändert als Quartett bei $\delta = 18$ ppm (Methyl-Gruppen) und als Dublett bei $\delta = 13$ ppm (Methin-Gruppen) in Resonanz.

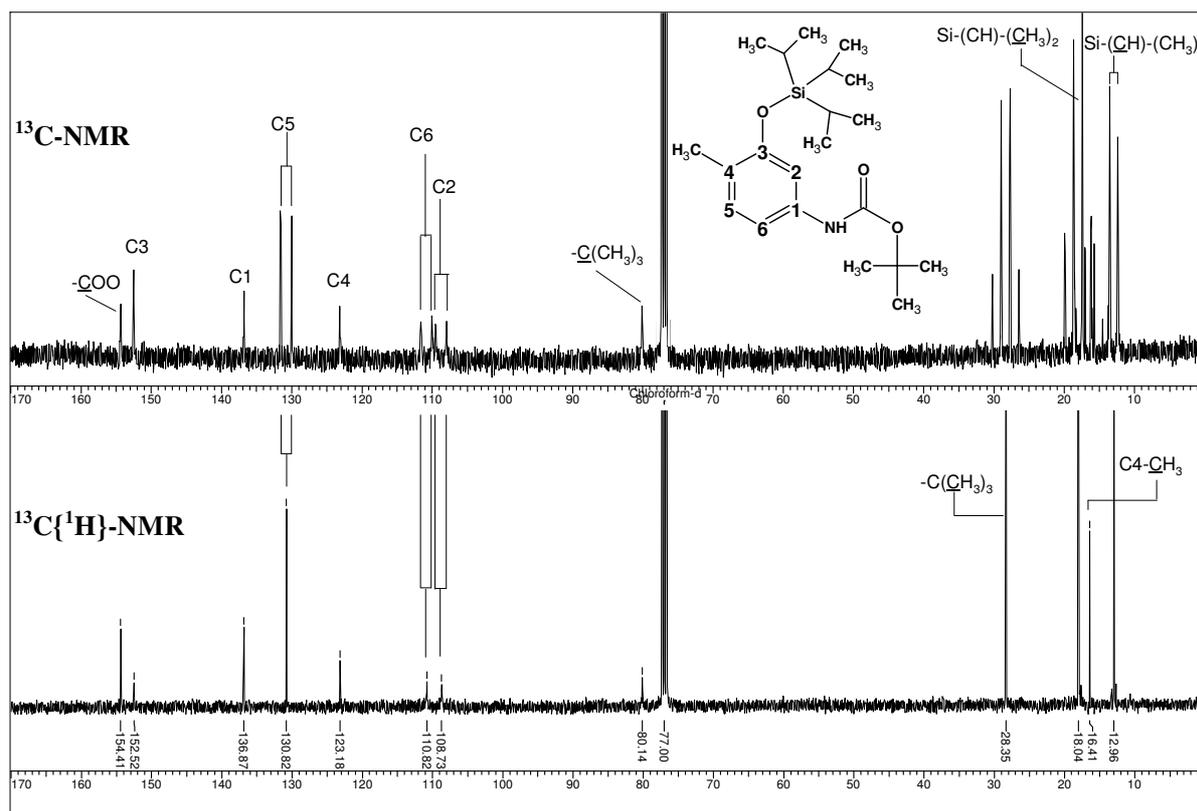


Abbildung 4.2.8: Vergleich des $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -Spektrum und ^{13}C -Spektrum von *tert*-Butyl-(4-methyl-3-(triisopropyl-silyloxy)-phenyl)-carbamate **81**. (CDCl_3 , $\delta = 77,00$ ppm)

4.2.1.3 Herstellung von 6-Hydroxy-5-methyl-isatin (**76**)

4.2.1.3.1 Synthese und Mechanismus

Der Mechanismus der DOM-Reaktion (directed ortho metallation) lässt sich folgendermaßen beschreiben: In einem ersten Reaktionsschritt wird das TIPS- und BOC-geschützte Anilin **81** mittels $^t\text{BuLi}$ in die Di-Lithium-Verbindung **82** überführt (Abb. 4.2.9). Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Verwendung der starken Base $^t\text{BuLi}$ in Kombination mit Diethylether als Lösungsmittel bei einer Temperatur von -20°C . Unter diesen Bedingungen ist die Reaktivität des monomer vorliegenden $^t\text{BuLi}$ besonders erhöht. Durch die starke Basizität des $^t\text{BuLi}$ wird neben der Abstraktion des NH-Wasserstoff-Atoms (Zwischenverbindung **85**) die direkte Deprotonierung am Phenyl-Kern ermöglicht und eine mögliche Deprotonierung der vorhandenen Methyl-Gruppe unterdrückt [Snieckus, 1990].

Nach Deprotonierung des NH-Wasserstoff-Atoms wird somit Zwischenverbindung **85** von einem zweiten Äquivalent $^t\text{BuLi}$ angegriffen wobei das lithiierte O-Atom von **85** als Ligand für das zweite $^t\text{BuLi}$ -Äquivalent dient und somit dirigierend auf den zweiten protophilen

Angriff wirkt [Muchowski und Venuti, 1980; Reed et al., 1988; MacDonald und Poindexter, 1987; Stanetty et al., 1992; Alvarez et al., 1992]. Der Angriff erfolgt somit in *ortho*-Position zur N-BOC-Gruppe, wobei die sperrige Triisopropylsilyl-Schutzgruppe durch ihre räumliche Größe, die Metallierung auf das *ortho*-Proton zur O-TIPS-Gruppe unterbindet [Kondo et al., 1997]. Die zweite Metallierung findet somit in *para*-Position zur O-TIPS-Gruppe statt.

Die Umsetzung der Di-Litium-Verbindung **82** mit Diethyloxalat **83** als agierendem Elektrophil ergibt den α -Ketoester **84**, der unter sauren Reaktionsbedingungen die TIPS- und BOC-Schutzgruppe abspaltet. Der anschließend erfolgende Angriff des Amins auf den Ketoester ergibt über einen Additions-Eliminierungs-Mechanismus das Isatin **76**.

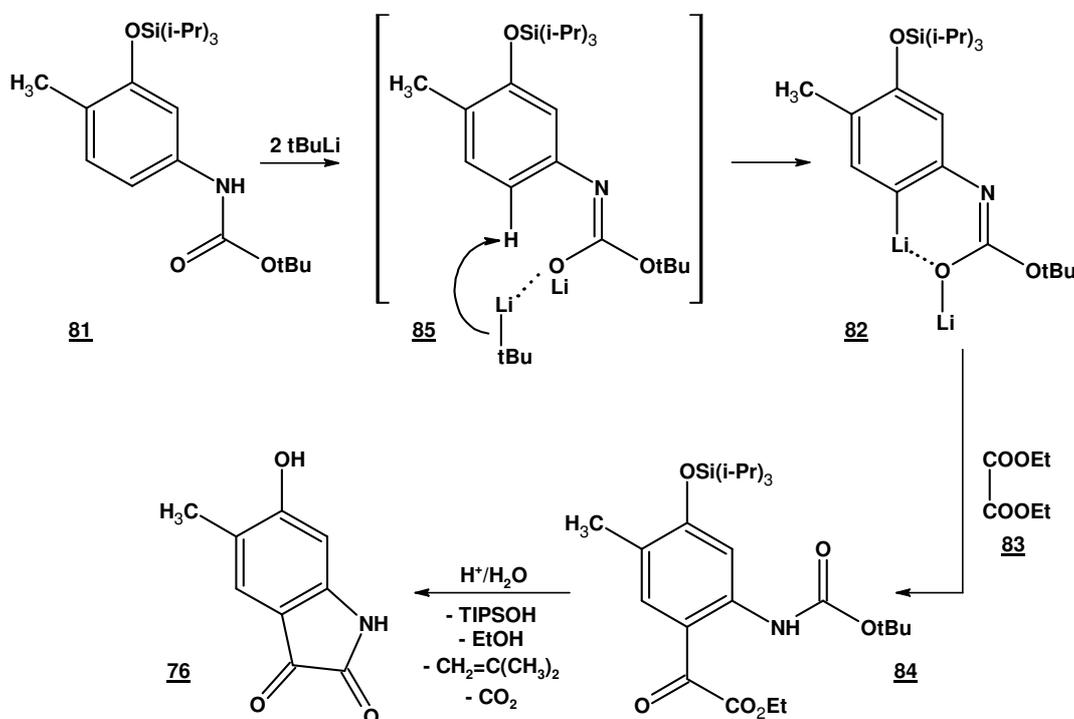


Abbildung 4.2.9: Reaktionsmechanismus zur Herstellung von 6-Hydroxy-5-methyl-isatins **76**

Die Ausbeute betrug nach säulenchromatographischer Aufarbeitung 20 %. Die geringe Ausbeute ist wahrscheinlich durch den gleichzeitig stattfindenden Angriff von $t\text{BuLi}$ auf die vorhandene Methyl-Gruppe zu erklären.

4.2.1.3.2 $^1\text{H-NMR}$ -Daten des 6-Hydroxy-5-methyl-isatins (**76**)

Aus den Signalen des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums (s. Abb. 4.2.10) ist erkennbar, dass das Entfernen der Schutzgruppen sowie der Ringschluss erfolgreich zu 6-Hydroxy-5-methyl-isatin **76** geführt haben.

Bei tiefem Feld treten im Vergleich zur Ausgangsverbindung **81** zwei neue Signale als Singulett auf. Das breite Singulett bei $\delta = 11,20$ ppm wird von der Hydroxy-Funktion in Position 6 und das Singulett bei $\delta = 10,87$ ppm, charakteristisch für Isatine, von dem amidische Proton der NH-Gruppe verursacht.

Im aromatischen Resonanzbereich verringert sich das $^1\text{H-NMR}$ der Ausgangsverbindung **81** auf die 2 Signale eines zweifach substituierten Isatins. Die Signale der zwei Aryl-Protonen treten bei $\delta = 7,26$ ppm und $\delta = 6,34$ ppm als Singulett in Resonanz, wobei das Signal bei tiefem Feld, $\delta = 7,26$ ppm H-4 in *ortho*-Position zur Methyl-Gruppe zugeordnet wird. Das Signal von H-7 erfährt auf Grund der stärkeren Abschirmung durch die in *ortho*-Position stehenden Hydroxy- und Amino-Gruppe eine stärkere Hochfeldverschiebung und tritt bei $\delta = 6,34$ ppm in Resonanz. Das Signal der Protonen der Methyl-Gruppe in Position 5 des Isatins treten bei $\delta = 2,01$ ppm als Singulett auf.

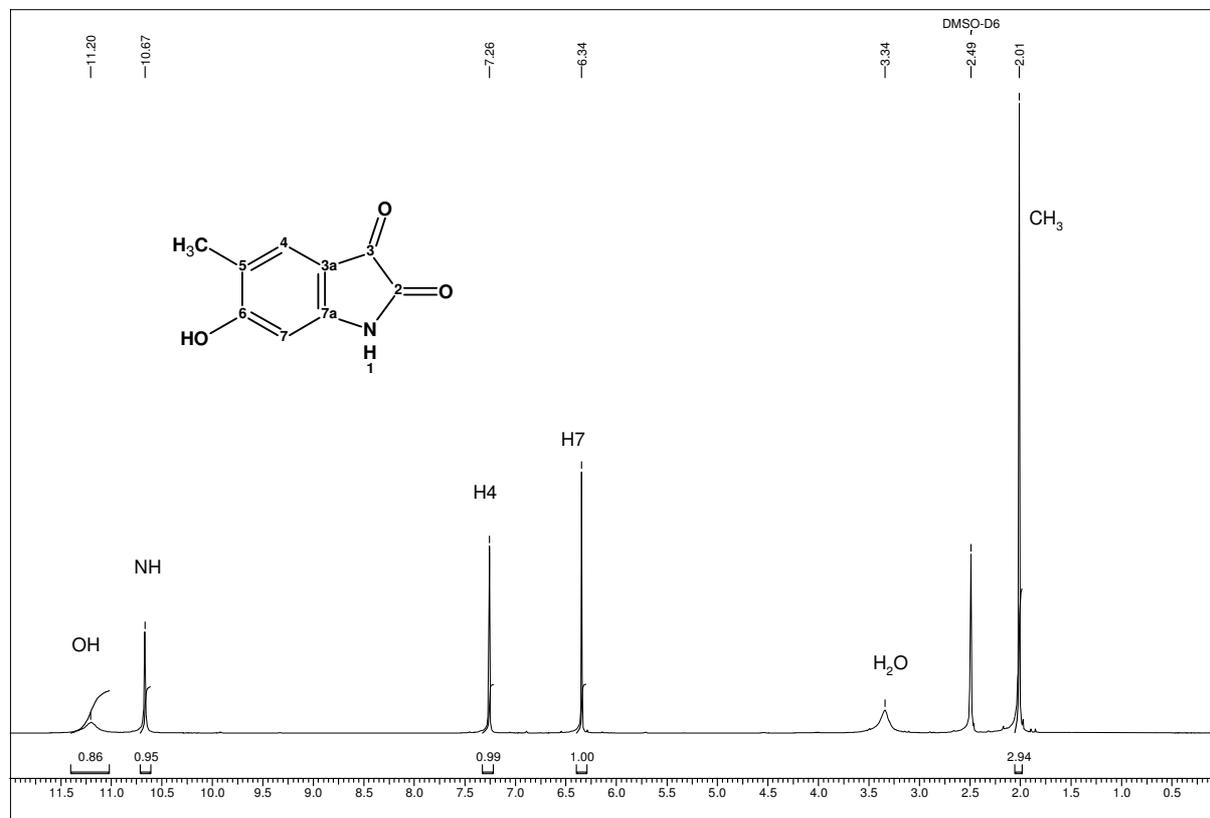


Abbildung 4.2.10: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 6-Hydroxy-5-methyl-isatin **76** (DMSO-d_6 , $\delta = 2,49$ ppm)

4.2.1.3.3 ^{13}C -NMR-Daten des 6-Hydroxy-5-methyl-isatins (**76**)

Abbildung 4.2.11 zeigt das ^{13}C -NMR, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR sowie das ^{13}C -DEPT-NMR-Spektrum von 6-Hydroxy-5-methyl-isatin **76**.

Die Zuordnung der Signale erfolgt mit Hilfe Inkrementabschätzungen, unter Berücksichtigung der Kopplungskonstanten und des zusätzlich aufgenommenen ^{13}C -DEPT-Spektrums.

Das Signal des Carbonyl-C-Atoms C-3 tritt, charakteristisch für Isatin-Verbindungen, am weitesten tieffeldverschoben, bei $\delta = 181,2$ ppm als Singulett in Resonanz und ist als quartäres C-Atom im ^{13}C -DEPT-NMR nicht zu erkennen. Das Singulett bei $\delta = 165,7$ ppm entspricht dem amidischen C-Atom C-2. Das Signal des quartären C-Atoms C-6 erfährt durch die direkte Verbindung zur Hydroxy-Gruppe, im Vergleich zu dem unsubstituierten Isatin, eine starke Tieffeldverschiebung ($\delta = 161,2$ ppm, $\Delta = + 22,8$ ppm). Relativ unverändert im Vergleich zum unsubstituierten Isatin tritt das Signal von C-Atom C-7a bei $\delta = 152,4$ ppm in Resonanz. Die zwei verbleibenden Singulett, die ebenfalls kein Signal im ^{13}C -DEPT-NMR ergeben, gehören zu C-Atom C-5 bei $\delta = 119,3$ ppm und C-3a bei $\delta = 109,6$ ppm. Beide Signale erfahren durch ihre *ortho*- bzw. *para*-Stellung zur Hydroxy-Gruppe im Vergleich zum unsubstituierten Isatin eine Hochfeldverschiebung ($\Delta = - 3,5$ ppm bzw. $- 8,2$ ppm).

Die beiden Dubletts bei $\delta = 127,8$ ppm und $\delta = 96,7$ ppm des ^{13}C -NMR, welche auch ein Signal im ^{13}C -DEPT-NMR ergeben, werden den tertiären C-Atomen C-4 und C-7 zugeschrieben. Das Signal von C-7 erfährt durch die direkte *ortho*-Position zur Hydroxy-Gruppe eine Verschiebung zu höherem Feld und ist somit dem Signal bei $\delta = 98,7$ ppm zuzuordnen. Das Signal von C-4 erfährt hingegen durch die *meta*-Position der Hydroxy-Funktion eine leichte Tieffeldverschiebung ($\Delta = + 3,1$ ppm) im Vergleich zum unsubstituierten Isatin und tritt bei $\delta = 127,8$ ppm in Resonanz. Die Kopplungskonstanten von 161 Hz bzw. 163 Hz liegen im typischen Bereich von $^1\text{J}_{\text{CH}}$ -Kopplungen.

Das verbleibende Signal bei $\delta = 15,4$ ppm ist der Methyl-Gruppe in Position 5 zuzuschreiben. Es tritt als Quartett ($^1\text{J}_{\text{CH}} = 128$ Hz) in Resonanz.

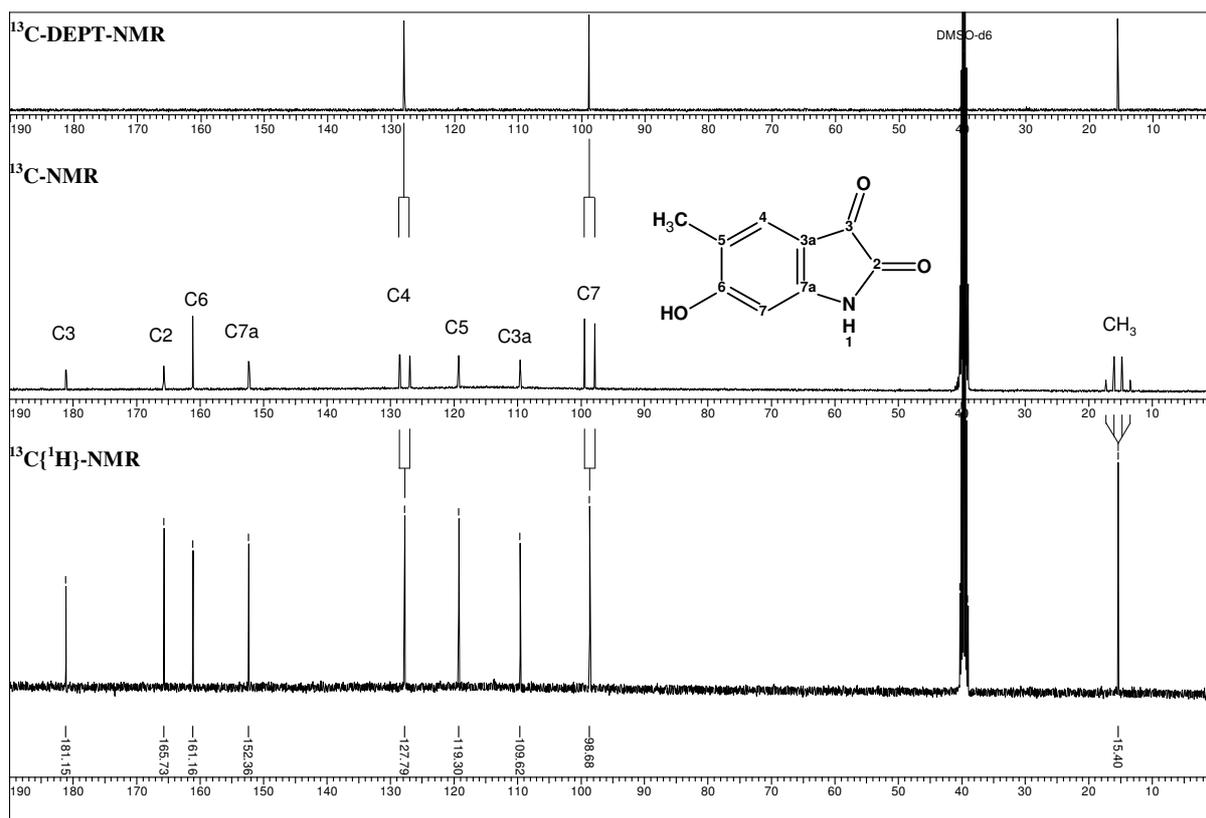


Abbildung 4.2.11: $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-, ^{13}C -NMR- und ^{13}C -DEPT-Spektrum von 6-Hydroxy-5-methyl-isatin **76** (DMSO- d_6 , $\delta = 39,70$ ppm)

4.2.1.4 Herstellung von 6-Hydroxy-5-methyl-indirubin (**74**): Metabolit 2

4.2.1.4.1 Synthesekonzept und Mechanismus

Die Herstellung der Indirubin-Derivate erfolgt durch Kondensation von 6-Hydroxy-5-methylisatin **74** mit Indoxyl-3-acetat **42** unter Schutzgas und Natriumcarbonat in Methanol. Das Isatin-Derivat wird, um einer unerwünschten Indigo-Bildung entgegenzuwirken, im Vergleich zum Indoxyl-3-acetat **42** im Überschuss (10-15 mol-%) eingesetzt.

Der Mechanismus (s. Abb. 4.2.12) der Umsetzung basiert auf einer Aldol-Kondensation. Die Reaktion wird im wasserhaltigen Methanol durchgeführt, so dass Hydroxid-Anionen vorliegen die die Esterbindung im Indoxyl-3-acetat **42** hydrolysieren. Es entsteht ein reaktives Indoxylat-Anion **86**, das nucleophil am reaktiven Carbonyl-C-Atom in Position 3 des Isatin-Derivates **76** angreift. Nach Aufnahme eines Protons entsteht die Doppelbindung des Indirubins **74** durch Wasserabspaltung. [Thommet, 2001]

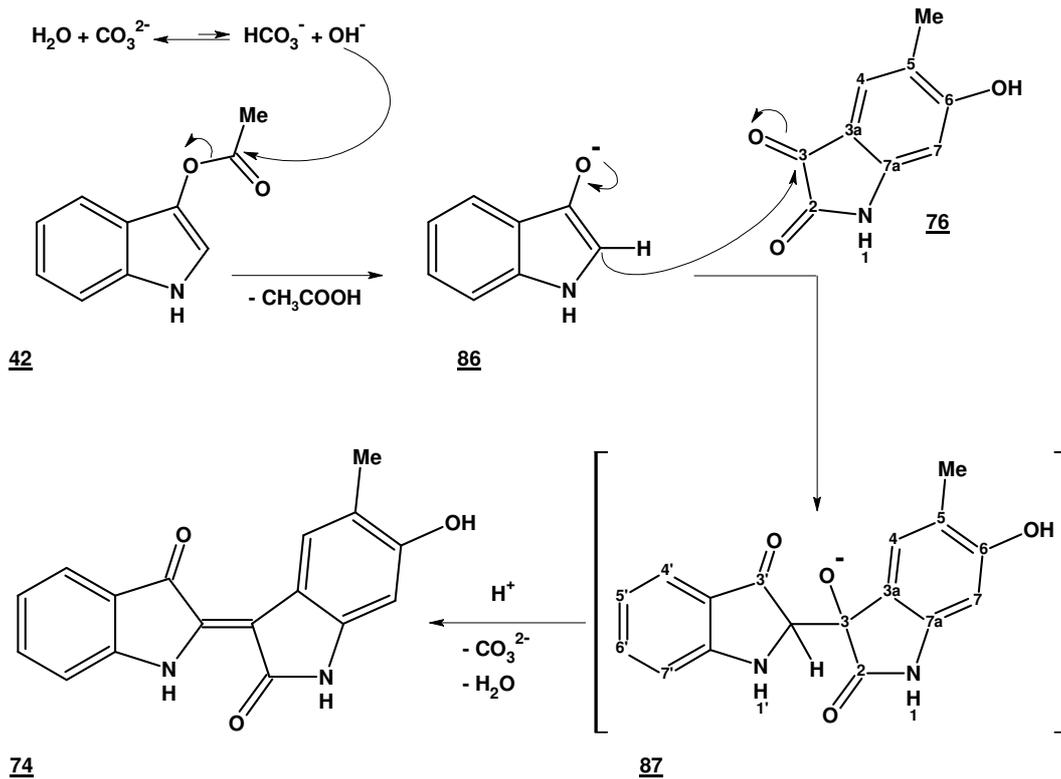


Abbildung 4.2.12: Reaktionsmechanismus zur Bildung von 6-Hydroxy-5-methyl-indirubin **74** [Thommet, 2001]

Die Ausbeute an 6-Hydroxy-5-methyl-indirubin **56** betrug allerdings nur 16 %. Die geringe Ausbeute ist dadurch zu erklären, dass 6-Hydroxy-5-methyl-indirubin **74** nicht wie bisherige Indirubin-Derivate im Reaktionsansatz als Niederschlag ausfällt, sondern durch Extraktion und anschließende säulenchromatographische Trennung isoliert werden musste.

Die Reinheit und Identität des 6-Hydroxy-5-methyl-indirubins **74** wurde dünnschichtchromatographisch, ^1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopisch belegt.

4.2.1.4.2 ^1H -NMR-Daten des 6-Hydroxy-5-methyl-indirubins (**74**)

Charakteristisch für Indirubin-Verbindungen treten bei tiefem Feld die Signale der beiden NH-Protonen jeweils als Singulett in Resonanz (Abb. 4.2.13). Bei einer chemische Verschiebung von $\delta = 10,69$ ppm und bei $\delta = 10,62$ ppm treten das amidische Proton NH1 sowie das nicht-amidische Proton NH1' in Resonanz. Ebenfalls bei tiefem Feld, $\delta = 9,97$ ppm, tritt das phenolische OH-Signal als Singulett auf.

Aus dem Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Daten von 6-Hydroxy-5-methyl-indirubin **74** mit den Daten von 5-Methyl-indirubin **15** (Tab. 4.2.1) geht hervor, dass die H-Protonen des unsubstituierten Ringes des aromatischen Systems (gestrichenes System) keine messbaren Veränderungen erfahren. So treten die Signale der Protonen H-4' und H-7' unverändert als Dublett bei $\delta = 7,60$ ppm (H-4', $^3J_{\text{H,H}} = 7,7$ Hz) und $\delta = 7,37$ ppm (H-7', $^3J_{\text{H,H}} = 8,2$ Hz) und Proton H-6', sowie H-5' als Triplet bei $\delta = 7,52$ ppm (H-6', $^3J_{\text{H,H}} = 7,7$ Hz) und $\delta = 6,96$ ppm (H-5', $^3J_{\text{H,H}} = 7,4$ Hz) in Resonanz.

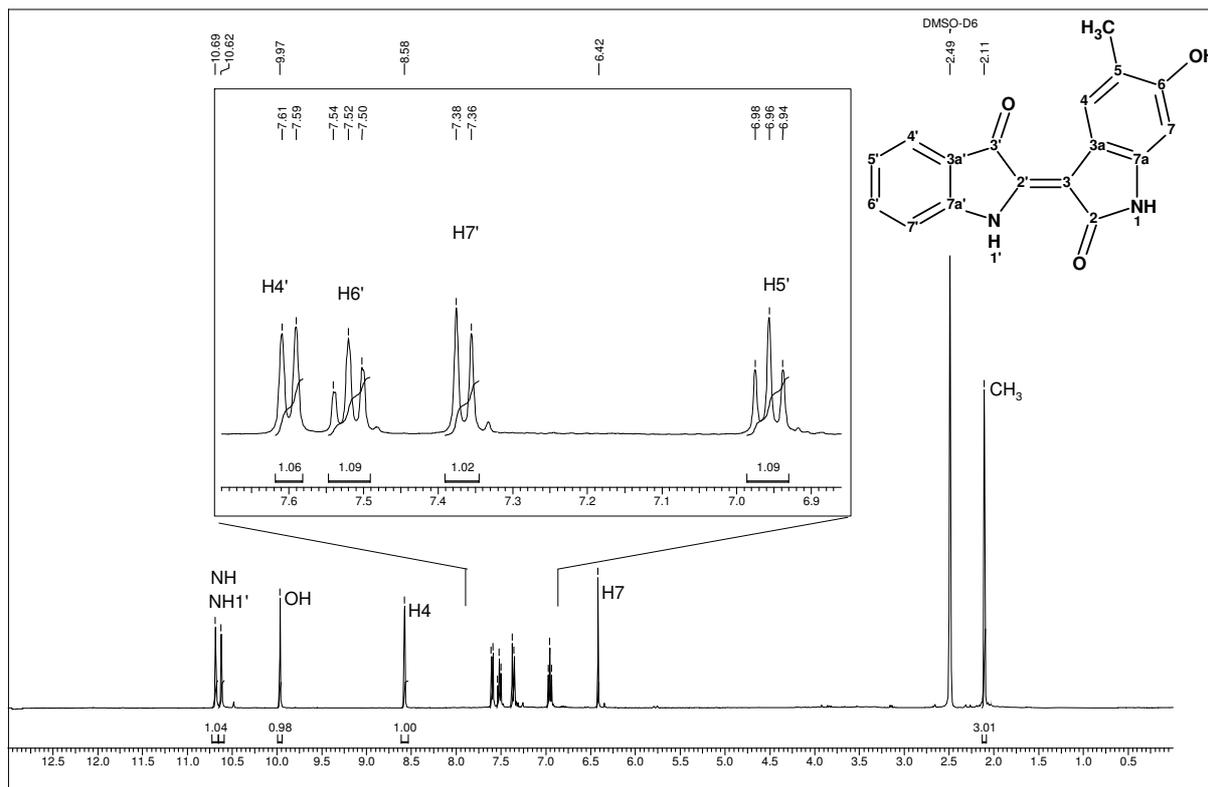


Abbildung 4.2.13: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 6-Hydroxy-5-methyl-indirubin **74** (DMSO-d_6 , $\delta = 2,49$ ppm)

Typisch für Indirubine ist die starke Tieffeldverschiebung des Signals für H-4 (8,58 ppm bei **74**) die durch den Anisotropie-Effekt, ausgelöst durch die räumliche Nähe des Carbonyl-Sauerstoff-Atoms in Position 3', verursacht wird. Wie aus Tabelle 4.2.1 erkennbar ist, erfährt das Signal von H-4 durch Einführung der Hydroxy-Gruppe im Vergleich mit 5-Methylindirubin **6** eine leichte Hochfeldverschiebung von $\Delta = -0,05$ ppm. Einen stärkeren Einfluss besitzt der Hydroxy-Substituent auf das in *ortho*-Position stehende Proton H-7. Es tritt als Singulett bei $\delta = 6,42$ ppm in Resonanz und erfährt im Vergleich zum 5-Methylindirubin **6** eine Hochfeldverschiebung von $\Delta = -0,37$ ppm.

Das verbleibende Singulett bei $\delta = 2,11$ ppm entspricht den Protonen der Methyl-Gruppe welche ebenfalls eine Hochfeldverschiebung von $\Delta = - 0,22$ ppm im Vergleich zu 5-Methylindirubin **6** erfahren.

Tabelle 4.2.1: Vergleich der erhaltenen $^1\text{H-NMR}$ Signale mit den $^1\text{H-NMR}$ Signale von 5-Methylindirubin (**6**) [Hössel, 1999b] und den aus Inkrementberechnung gewonnenen Daten [Morales-Ríos und Joseph-Nathan, 1991; Hesse, Maier, Zeeh, 1995] in δ [ppm].

	C4H	C4'H	C6'H	C7'H	C6H	C5H	C5'H	C7H	Me
6	8,63	7,64	7,58	7,42	7,08	-	7,00	6,79	2,33
Inkrement	8,46	7,65	7,56	7,39	-	-	7,02	6,26	
74	8,58	7,60	7,52	7,37	-	-	6,96	6,42	2,11

4.2.1.4.3 $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten des 6-Hydroxy-5-methylindirubins (**74**)

Im $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR erkennt man 17 C-Atome in einem Bereich zwischen $\delta = 16,2$ ppm und $\delta = 188,1$ ppm (Abb. 4.2.14). Das Signal des aliphatischen C-Atoms der Methyl-Gruppe in Position 5 tritt bei hohem Feld, $\delta = 16,2$ ppm, in Resonanz.

Aus den in Abbildung 4.2.14 dargestellten Vergleich des $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR mit dem $^{13}\text{C-DEPT-NMR}$ -Spektrum von 6-Hydroxy-5-methylindirubin **74** gehen eindeutig die Resonanzen des primären C-Atoms (Methyl-Gruppe) und der sechs nicht substituierten aromatischen C-Atome (C-4, C-7 und C-4', C-5', C-6', C-7'), die jeweils charakteristisch ein positives Signal im $^{13}\text{C-DEPT}$ -Spektrum ergeben, hervor.

Von den sechs nicht substituierten aromatischen C-Atomen sind 4 Resonanzen den aromatischen C-Atomen (C-4' bis C-7') des „gestrichenen“ Molekülteils zuzuordnen. Sie erfahren im Vergleich zum nicht-hydroxylierten 5-Methylindirubin **6** nur geringfügige Veränderungen. Ebenfalls sind für die verbleibenden tertiären und quartären C-Atome des „gestrichenen“ Molekülteils keine deutlichen Signalverschiebungen durch die Einführung der Hydroxy-Gruppe im Vergleich zu 5-Methylindirubin **6** zu erkennen (Tab. 4.2.2).

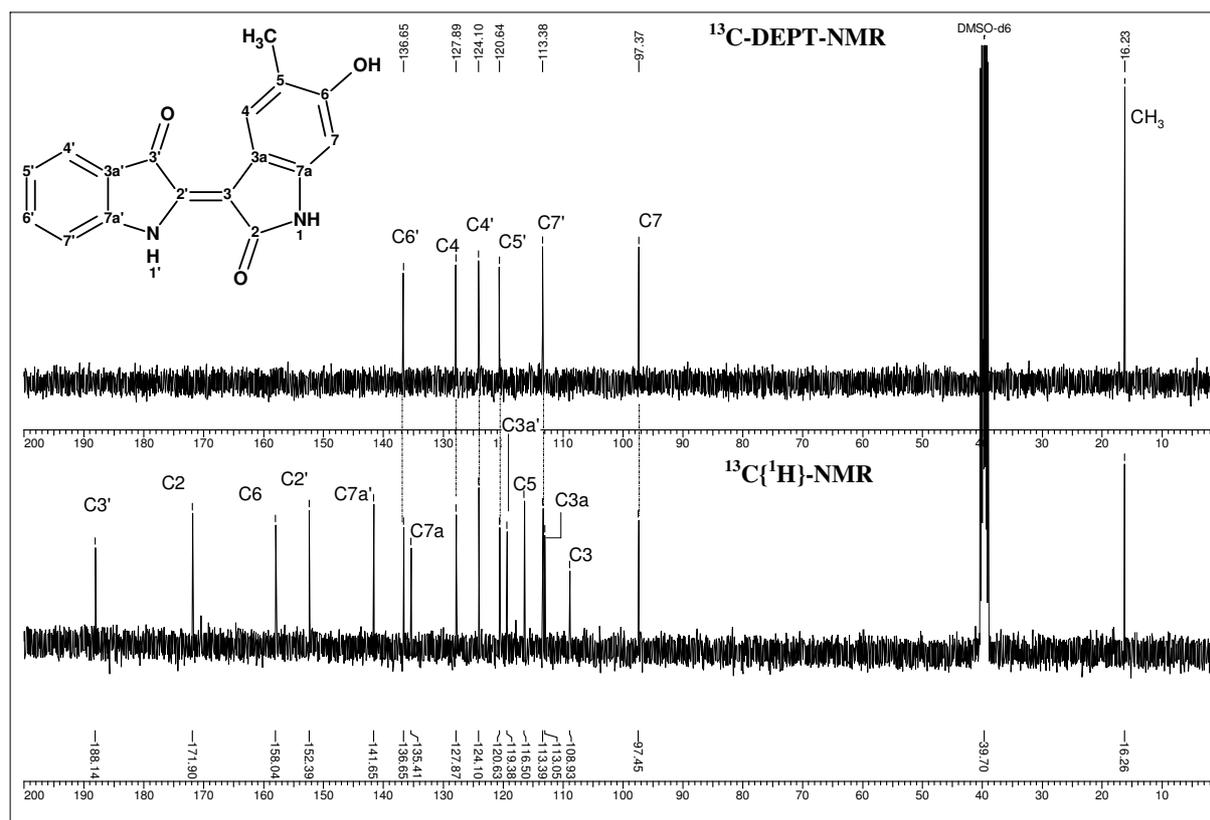


Abbildung 4.2.14: Vergleich des $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -Spektrum und ^{13}C -DEPT-Spektrum von 6-Hydroxy-5-methylindirubin **74**. (DMSO- d_6 , $\delta = 39,70$ ppm)

Die stärkste Veränderung der chemischen Verschiebung, im Vergleich zu 5-Methylindirubin **6**, ist für das Signal von C-6 ($\delta = 158,0$ ppm) zu erkennen. Es erfährt durch den direkten Einfluss der Hydroxy-Gruppe eine starke Tieffeldverschiebung von $\Delta = + 32,9$ ppm. Für die zur Hydroxy-Gruppe in *ortho*-Position stehenden C-Atome C-5 und C-7 sind deutliche Hochfeldverschiebungen der Signale, im Vergleich zu 5-Methylindirubin **6**, die Folge. Das Signal von C-5 tritt bei $\delta = 116,5$ ppm ($\Delta = -13,2$ ppm) als Singulett und C-Atom C-7 bei $\delta = 97,5$ ppm ($\Delta = -11,7$ ppm) als Dublett mit einer Kopplungskonstante von $^1J_{\text{C,H}} = 160$ Hz in Resonanz (^{13}C -NMR-Daten, s. Kap. 6.6.2). Ebenfalls als Dublett (positives Signal im ^{13}C -DEPT-NMR), tritt das Signal von C-4, bei $\delta = 127,9$ ppm ($^1J_{\text{C,H}} = 163$ Hz) mit einer leichten Hochfeldverschiebung von $\Delta = -1,8$ ppm, in Resonanz. Eine starke Hochfeldverschiebung von $\Delta = - 8,4$ ppm erfährt das Signal des zur Hydroxy-Gruppe in *para*-Position stehenden C-3a, welches bei $\delta = 113,1$ ppm als Singulett in Resonanz tritt. Das Signal des in *meta*-Position stehenden C-Atoms C-7a ($\delta = 135,4$ ppm; Singulett) erfährt ebenfalls eine Hochfeldverschiebung ($\Delta = - 2,68$ ppm). Eine leichte Tieffeldverschiebung ist für das Signal von C-3 zu beobachten. Es tritt als Singulett bei $\delta = 108,9$ ppm ($\Delta = + 2,1$ ppm) in Resonanz.

4.2.2 Metabolit M3: 6,7'-Dihydroxy-5-methylindirubin (75)

Zur Herstellung des Metaboliten M3, dem 6,7'-Dihydroxy-5-methylindirubin 75 wird ein bisher noch nicht beschriebenes Indoxyl-3-acetat-Derivat, 7-Hydroxy-indoxyl-3-acetat 77 und das zuvor synthetisierte 6-Hydroxy-5-methylisatin 76 benötigt.

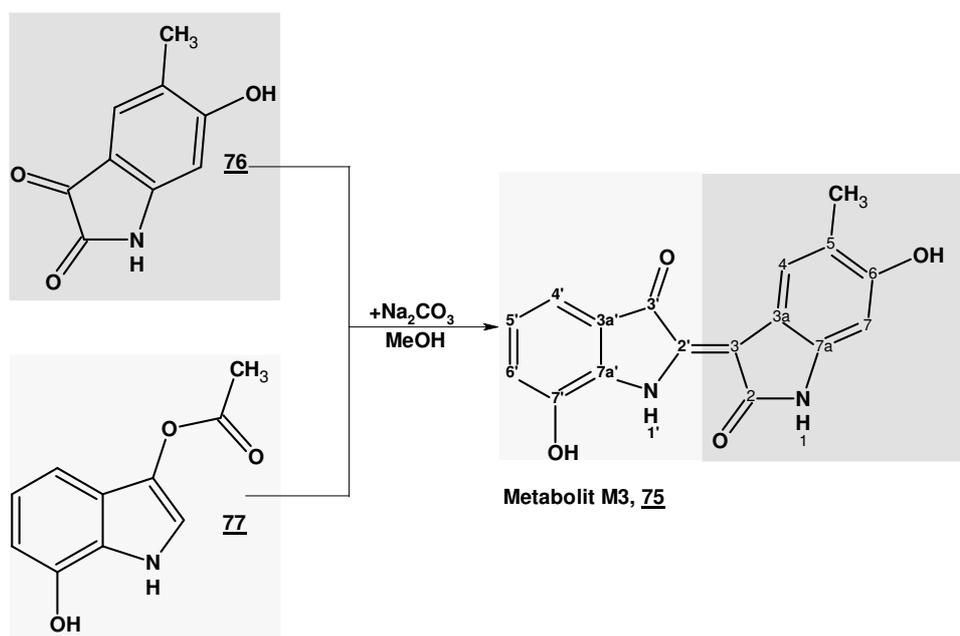


Abbildung 4.2.15: Herstellung von 6,7'-Dihydroxy-5-methylindirubin 75

4.2.2.1 *Synthesekonzept / Syntheseweg:* 6,7'-Dihydroxy-5-methylindirubin (75)

Substituierte Indoxyl-3-acetate 42R können aus substituierten *N*-Phenyl-glycin-*o*-carbonsäuren 66R in Anlehnung nach einer Vorschrift von Holt und Sadler aus dem Jahre 1958 synthetisiert werden (s. Kap. 2.5.1.2). Hierzu werden die substituierten *N*-Phenyl-glycin-*o*-carbonsäuren 66R mittels Essigsäureanhydrid zu Diacetylindoxyl-Derivaten 67 und anschließend durch gezielte Hydrolyse intermediär zu freien Indoxyl-Derivaten umgesetzt. Kontrollierte Acetylierung führt zu den gewünschten Indoxyl-3-acetat-Derivaten 42R (Abb. 4.2.16).

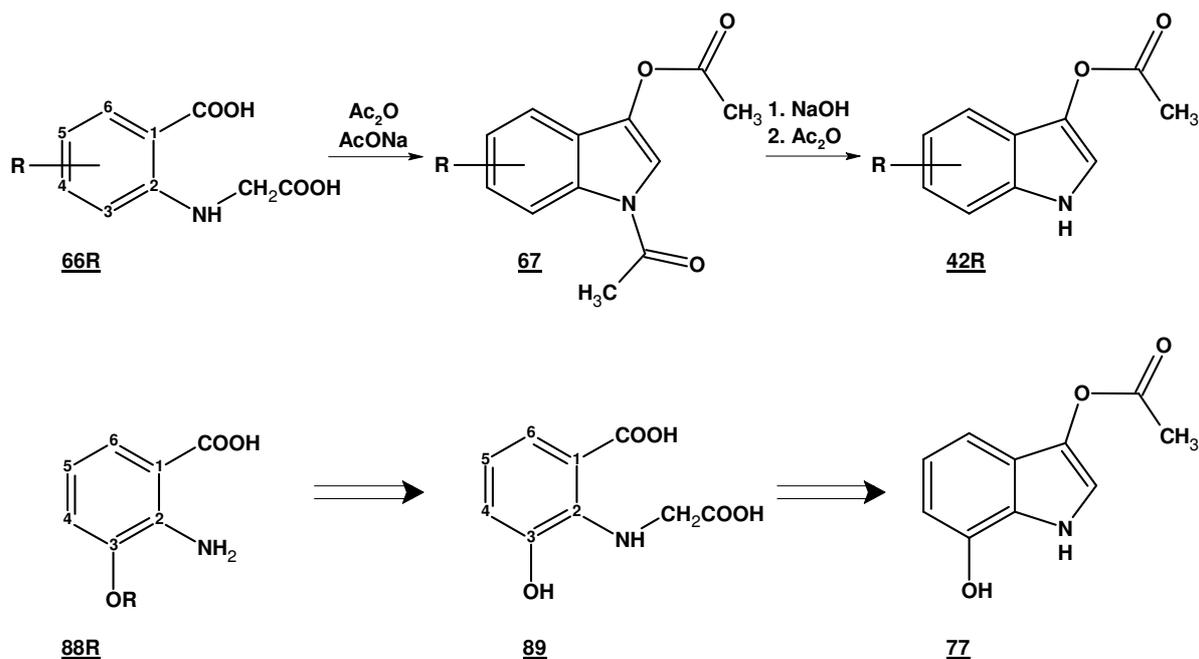


Abbildung 4.2.16: Herstellung von substituierten Indoxyl-3-acetaten **42R** aus substituierten *N*-Phenyl-glycin-*o*-carbonsäuren **66R**

4.2.2.2. *Synthese der benötigten Ausgangsverbindungen zur Herstellung von 7-Hydroxy-indoxyl-3-acetat (77)*

Zur Synthese des benötigten 7-Hydroxy-indoxyl-3-acetats **77** (Abb. 4.2.16), muss die substituierte *N*-Phenyl-glycin-*o*-carbonsäure **89** aus der geeigneten Anthranilsäure **88R** synthetisiert werden. Als Ausgangsverbindung kommt somit die 3-Hydroxy-2-amino-benzoesäure **88R** ($\text{R}=\text{OH}$) bzw. die identische hydroxy-geschützte Verbindung in Frage.

In der Literatur ist für in Position 3 substituierte Anthranilsäuren **88R** ($\text{R} = -\text{Hal}$ oder $-\text{Me}$) folgender Syntheseweg beschrieben. Die in Position 3 substituierte Anthranilsäure **90R** wird hierbei zuerst in ein Formalid **91R**, dann in ein Nitril **92R** und anschließend durch Verseifung mittels NaOH in *N*-Phenyl-glycin-*o*-carbonsäure **93R** überführt (s. Abb. 4.2.17).

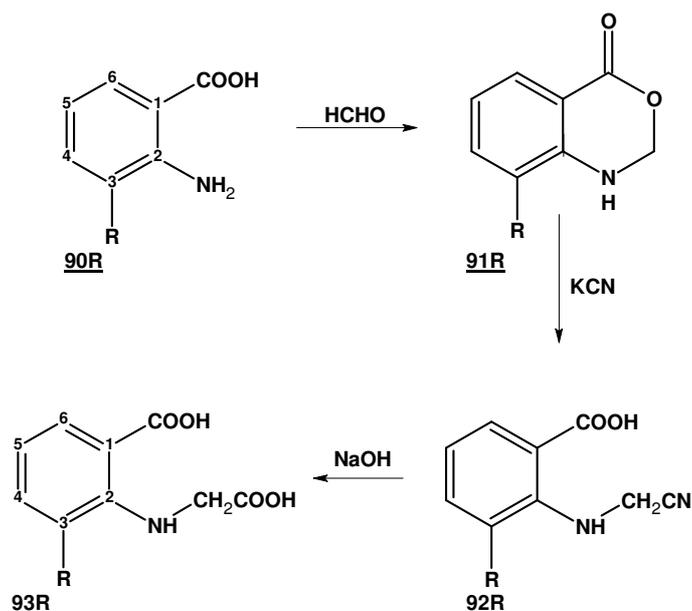


Abbildung 4.2.17: Syntheseweg für in 3 Position substituierte *N*-Phenyl-glycin-*o*-carbonsäure **93R** [Holt und Sadler, 1958]

Zur Synthese von 7-Hydroxy-indoxyl-3-acetat **77** wird als entsprechende Ausgangsverbindung somit 3-Hydroxy-2-amino-benzoesäure **94** verwendet. Sie kann nicht direkt eingesetzt werden da die Hydroxy-Gruppe zuerst durch Benzylierung geschützt werden muss (Abb. 4.2.18). Da eine direkte Benzylierung auch an der Amino-Gruppe stattfinden würde, muss von käuflicher 3-Acetaminobenzoessäure **95** ausgegangen werden. 3-Acetaminobenzoessäure **95** wird zuerst in Position 2 nitriert (Abb. 4.2.18). Mittels KOH wird die Acetamino- durch eine Hydroxy-Gruppe ersetzt. Anschließende Benzylierung ergibt 3-Benzyloxy-2-nitro-benzoesäurebenzylester **98**, der durch Verseifen mit NaOH in 3-Benzyloxy-2-nitro-benzoesäure **90** überführt wird. Die Reduktion mit Natriumdithionit führt zu 2-Amino-3-benzyloxy-benzoesäure **100**. Anschließend wird analog der Synthese von Holt und Sadler (Abb. 4.2.17) über **101** und **102** zur *N*-Phenyl-glycin-*o*-carbonsäure **103** umgesetzt (Abb. 4.2.18).

Die 3-Benzyloxy-*N*-phenyl-glycin-*o*-carbonsäure **103** wird wie beschrieben (Kap. 4.2.2.1) in 6-Benzyloxy-indoxyl-3-acetat **105** überführt. Der Gesamtsyntheseweg zur Herstellung von 6-Benzyloxy-indoxyl-3-acetat **105** ist in Abbildung 4.2.18 dargestellt.

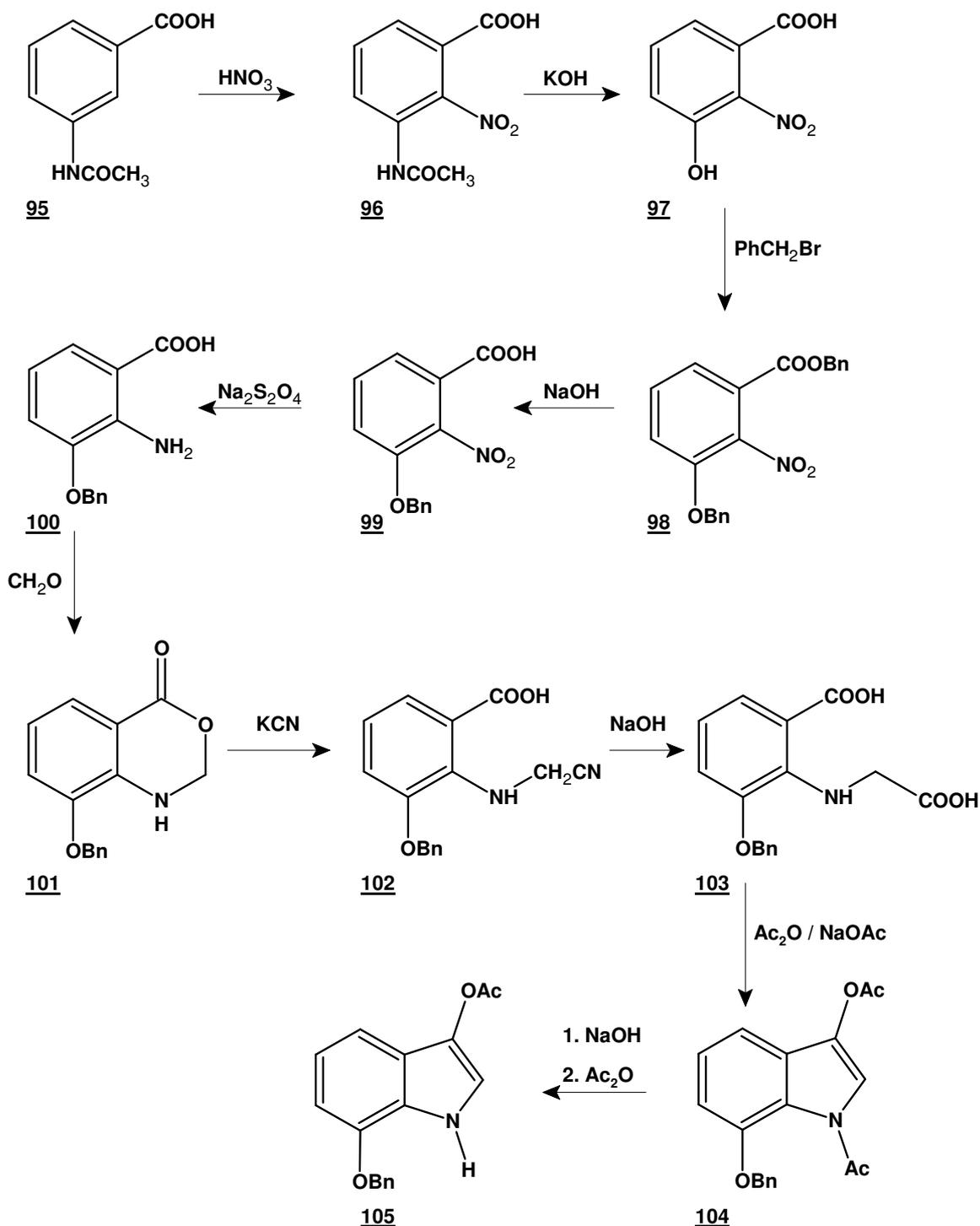


Abbildung 4.2.18: Gesamtsyntheseweg zur Herstellung von 6-Benzyloxy-indoxyl-3-acetat **105**

Bei dem beschriebenen Syntheseweg in Abbildung 4.2.18 stellt sich jedoch die letzte Umsetzung, die Deacetylierung von **104** und anschließende selektive Acetylierung zu **105**, als besonders kritischer und labortechnisch aufwendiger Reaktionsschritt dar. Außerdem müsste in einem zusätzlichen Reaktionsschritt die Benzyl-Gruppe noch entfernt werden. Deshalb wird alternativ, die Acetyl-Gruppe in der Position 3 (**104**) mit Natriumsulfit selektiv

abgespaltet und das entstandene 1-Acetyl-7-benzyloxyindoxyl **106** direkt sauer mit 6-Hydroxy-5-methylisatin **76** zu 6,7'-Dihydroxy-5-methylindirubin **75** kondensiert (Abb.4.2.19). Die saure Kondensation bietet den Vorteil, dass gleichzeitig die Schutzgruppen abgespalten werden. [Holt und Sadler, 1958; Nenitzescu und Raileanu, 1958; Rabiger et al., 1970; Su und Tsou, 1960; Schering AG, 2002]

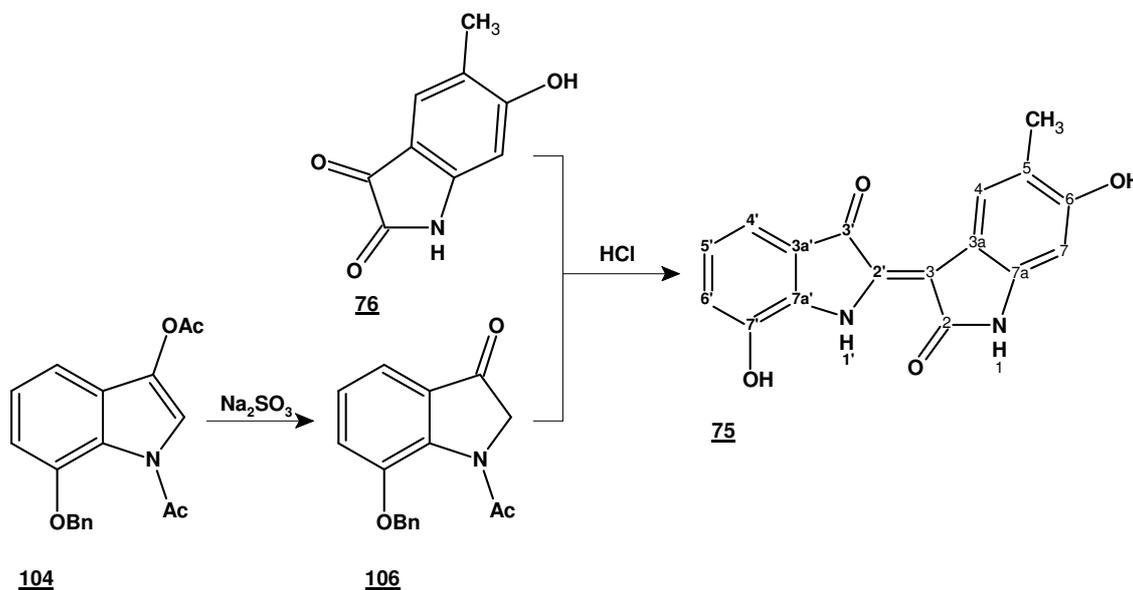


Abbildung 4.2.19: Alternativer Syntheseweg für 6,7'-Dihydroxy-5-methylindirubin **75**

Die Mechanismen und spektroskopischen Ergebnisse der einzelnen Zwischenschritte werden in folgenden Abschnitten beschrieben.

4.2.2.3 *Synthese der Ausgangsverbindungen zur Herstellung von N-Acetyl-7-benzyloxy-indolin-3-on (**106**)*

4.2.2.3.1 **Herstellung von 3-Acetamino-2-nitro-benzoesäure (**96**)**

4.2.2.3.1.1 Synthese und Mechanismus

Zur Einführung der Nitro-Gruppe wird 3-Acetamino-benzoesäure mit rauchender Salpetersäure bei 0°C umgesetzt. Das erhaltene Produktgemisch wird zur Isolierung der 3-Acetoamino-2-nitro-benzoesäure **96** aus Eisessig umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 27 % an braun-roter 3-Acetamino-2-nitro-benzoesäure **96**.

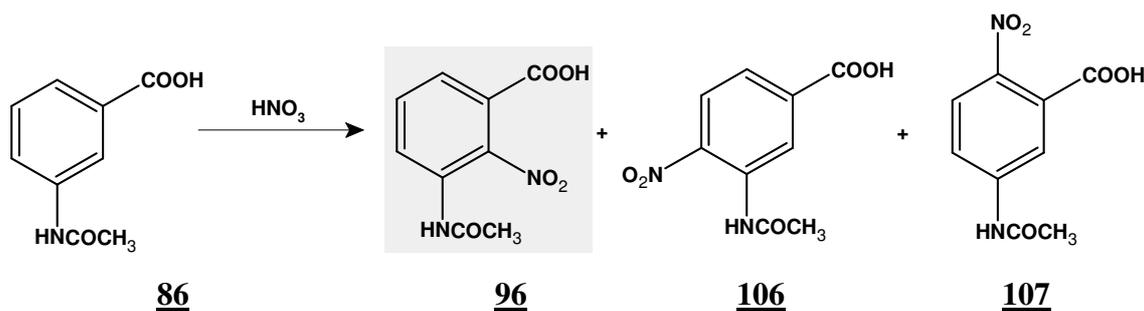


Abbildung 4.2.20: Herstellung von 3-Acetamino-2-nitro-benzoessäure **96**

Bei der Umsetzung handelt es sich um eine elektrophile Aromatensubstitution. Der dirigierender +M-Effekt der Acetamino-Gruppe bewirkt, dass die Substitution hier zum größten Teil in *ortho*-Position zur Acetamino-Gruppe stattfindet **96** [Hegedüs B, 1951] (Abb. 4.2.20). Durch Auskristallisation aus Essigester erhält man reines 3-Acetamino-2-nitro-benzoessäure **96**.

Die Reinheit und Identität der 3-Acetamino-2-nitro-benzoessäure **96** wurde dünnschicht-chromatographisch, ^1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopisch belegt. Die ^{13}C -NMR-Daten sind im experimentellen Teil, das Spektrum ist im Anhang unter Abbildung 32 zu finden.

4.2.2.3.1.2 ^1H -NMR-Daten der 3-Acetamino-2-nitro-benzoessäure (**96**)

Charakteristisch ist im ^1H -NMR-Spektrum von 3-Acetamino-2-nitro-benzoessäure (**96**), in Abbildung 4.2.21, bei tiefem Feld das Proton der Carboxy-Gruppe als breites Singulett bei $\delta = 13,88$ ppm zu erkennen. Bei $\delta = 9,97$ ppm tritt ein scharfes Singulett auf und wird dem NH-Proton der Acetamino-Gruppe zugeordnet. Die Protonen von H-4 und H-6 bilden ein Multipllett von $\delta = 7,74$ bis $7,72$ ppm. Etwas weiter zu hohem Feld verschoben, tritt das Signal von H-5 bei $\delta = 7,66$ ppm als Triplett mit einer $^3J_{\text{H,H}}$ -Kopplung von $7,7$ Hz in Resonanz.

Bei hohem Feld $\delta = 2,02$ ppm tritt im aliphatischen Resonanzbereich das Signal der drei Protonen der Methyl-Gruppe der Acetamino-Gruppierung als Singulett in Resonanz.

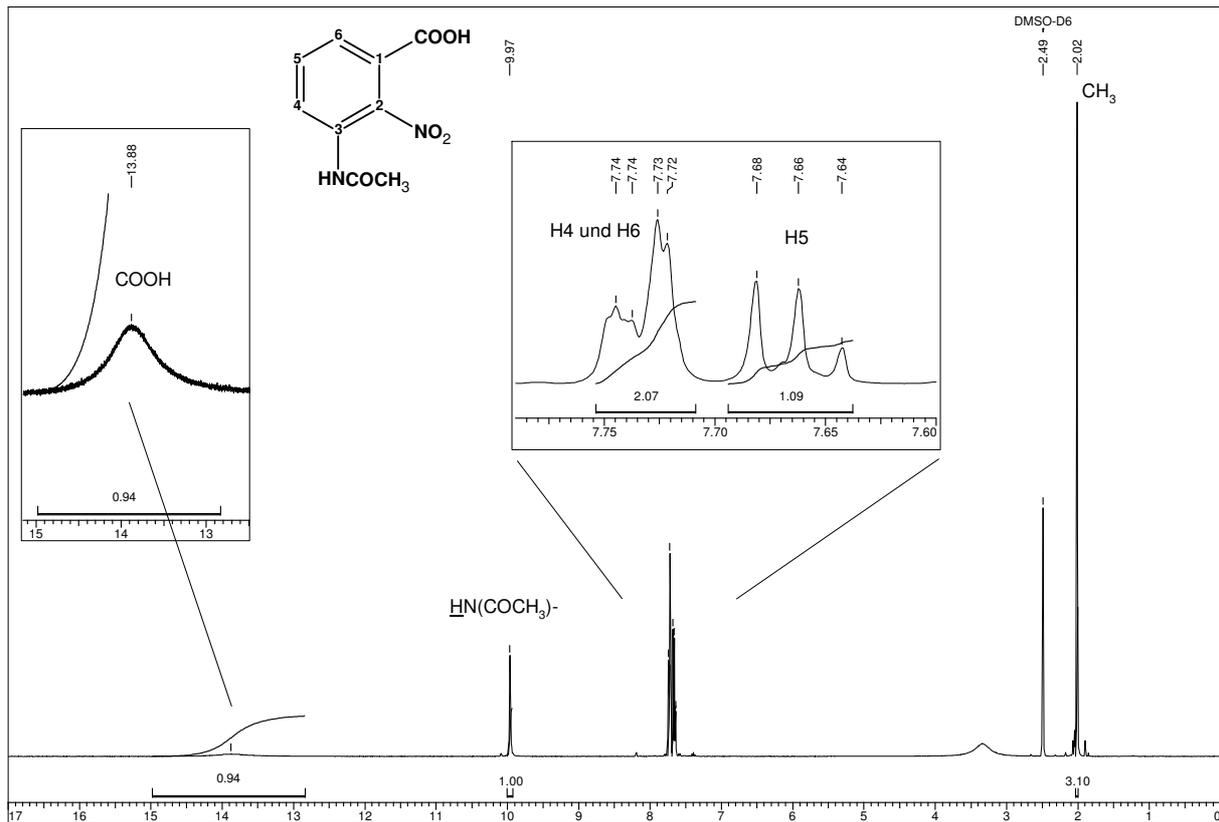


Abbildung 4.2.21: ^1H -NMR-Spektrum von 3-Acetamino-2-nitro-benzoesäure **96** (DMSO- d_6 , $\delta = 2,49$ ppm)

4.2.2.3.2 Herstellung von 3-Hydroxy-2-nitro-benzoesäure (**97**)

4.2.2.3.2.1 Synthese und Mechanismus

Der Austausch der Acetamino-Gruppe gegen die Hydroxy-Gruppe wird unter starken basischen Reaktionsbedingungen durchgeführt (Abb. 4.2.22).

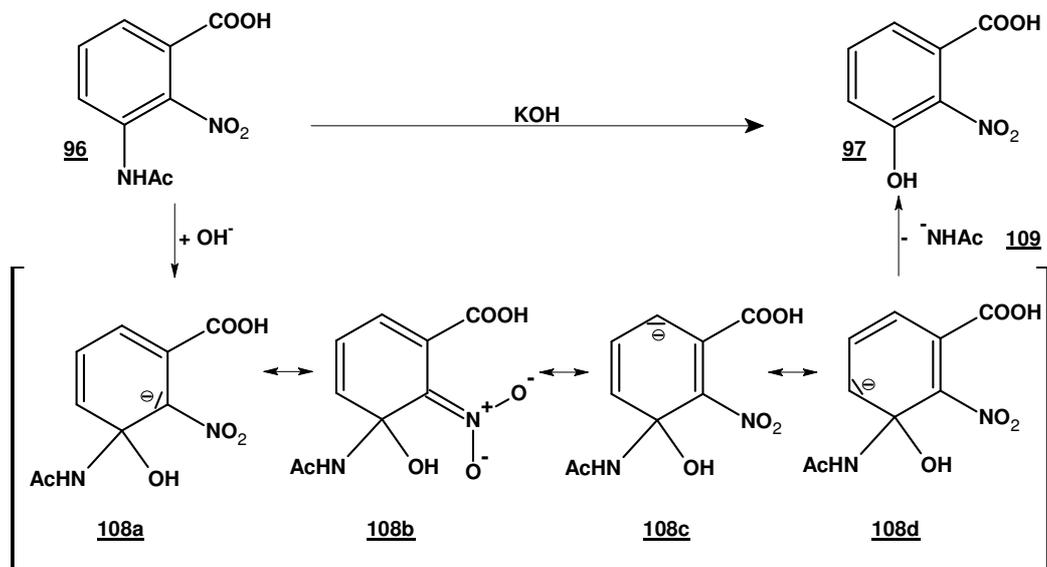


Abbildung 4.2.22: Synthese von 3-Hydroxy-2-nitro-benzoesäure **97**

Bei der Umsetzung mit KOH handelt es sich um eine nucleophile aromatische Substitutionsreaktion entsprechend dem Additions-Eliminierungsmechanismus. Durch Angriff des Hydroxid-Anions am Aromaten entsteht als Zwischenstufe ein Carbanion **108** („Meisenheimer-Komplex-analoge Zwischenstufe“), dessen negative Ladung über die verbleibenden C-Atome des Aromaten delokalisiert ist und durch das Vorhandensein elektronenziehender Substituenten stabilisiert wird (**108a-108d**). Die anschließende Abspaltung des Amidat-Ions **109** führt zur 3-Hydroxy-2-nitro-benzoesäure **97** (s. Abb. 4.2.22).

Die Reinheit und Identität der 3-Hydroxy-2-nitro-benzoesäure **97** wurde dünnschichtchromatographisch, ^1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopisch belegt. Die ^{13}C -NMR-Daten sind im experimentellen Teil sowie im Anhang unter Abbildung 33 zu finden.

4.2.2.3.2 ^1H -NMR-Daten der 3-Hydroxy-2-nitro-benzoesäure (**97**)

In dem ^1H -NMR-Spektrum, Abbildung 4.2.23, ist im Vergleich zur Ausgangsverbindung **96**, bei hohem Feld, das Singulett der Methyl-Protonen der Acetamino-Gruppe nicht mehr erkennbar. Bei tiefem Feld erkennt man zwei breite Singulets.

Im Vergleich zur Ausgangsverbindung **96** ist das Signal der Carboxy-Gruppe leicht hochfeldverschoben ($\delta = 13,27$ ppm). Das bei $\delta = 11,24$ ppm auftretende breite Singulett entspricht der eingeführten Hydroxy-Gruppe.

Die drei aromatischen Ring-Protonen H-4, H-5 und H-6 erfahren eine Hochfeldverschiebung von $\Delta = -0,2$ ppm bis $-0,44$ ppm. Das Signal von Proton H-5 ist bei $\delta = 7,46$ ppm als Triplett ($^3J_{\text{H,H}} = 7,9$ Hz) zu erkennen. Die Hydroxy-Gruppe bewirkt eine starke Abschirmung des *ortho*-ständigen H-4 ($\Delta = -0,44$ ppm), welches als Doppeldoublett bei $\delta = 7,29$ ppm in Resonanz tritt ($^3J_{\text{H,H}} = 8,1$ Hz; $^4J_{\text{H,H}} = 1,0$ Hz). Das Signal von H-6 erfährt im Vergleich zu 3-Acetamino-2-nitro-benzoesäure **96** ebenfalls eine Hochfeldverschiebung von $\Delta = -0,35$ ppm (*para*-Position zur Hydroxy-Gruppe) und besitzt identisch zu H-4 eine vicinale Kopplung von $^3J_{\text{H,H}} = 7,7$ Hz und eine long-range Kopplung von $^4J_{\text{H,H}} = 1,1$ Hz.

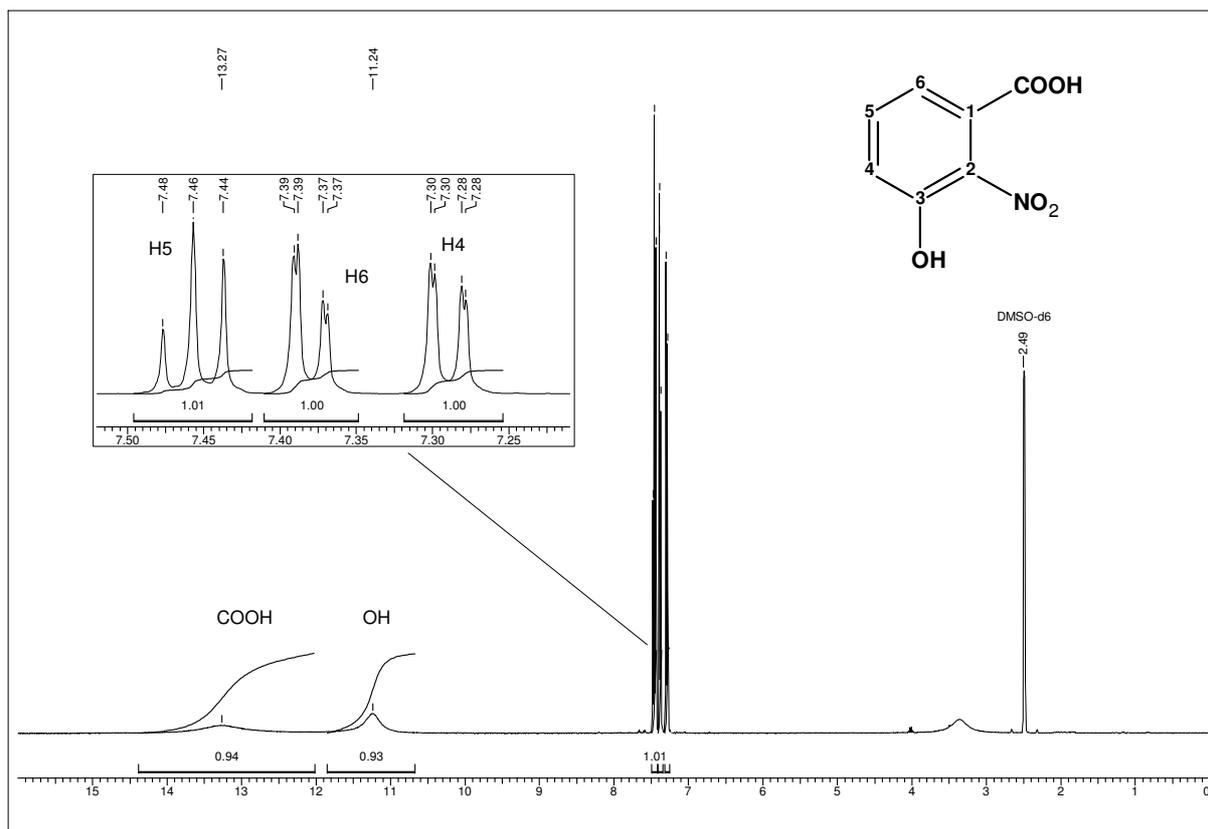


Abbildung 4.2.23: ^1H -NMR-Spektrum von 3-Hydroxy-2-nitro-benzoesäure **97** (DMSO- d_6 , $\delta = 2,49$ ppm)

4.2.2.3.3 Herstellung von 3-Benzyloxy-2-nitro-benzoesäure-benzylester (**98**)

4.2.2.3.3.1 Synthese und Mechanismus

Die Hydroxy-Gruppe muss auf Grund ihrer Reaktivität für den weiteren Reaktionsablauf deaktiviert werden. Dies wird durch die Umsetzung mit Benzylbromid erreicht.

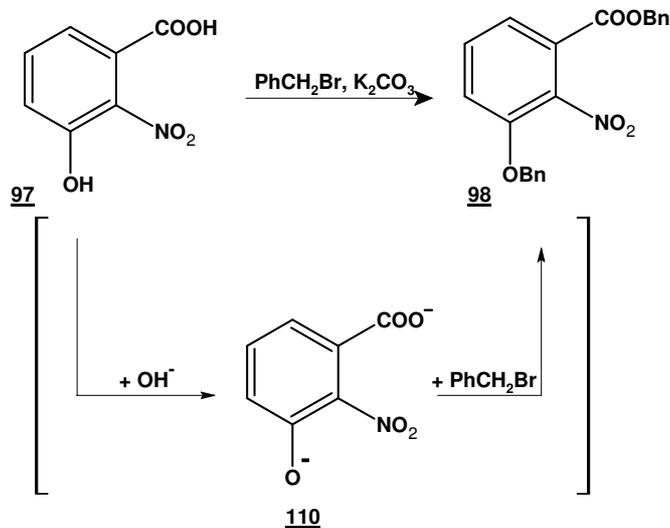


Abbildung 4.2.24: Synthese von 3-Benzyloxy-2-nitro-benzoesäure-benzylester **98**

Bei der Reaktion wird durch Kaliumcarbonat die Hydroxy- sowie Carboxy-Gruppe zuerst deprotoniert und ein Di-Anion **110** erzeugt. Die Hydroxy- sowie Carboxy-Ionen greifen beide in einer nucleophilen Substitution an der benzylichen Position des Benzylbromids an. Es entsteht somit die doppelt benzylierte Verbindung 3-Benzyloxy-2-nitro-benzoesäurebenzylester **98**.

Die Ausbeute an farblosen 3-Benzyloxy-2-nitro-benzoesäurebenzylester **98** betrug 78 %. Die Reinheit und Identität wurde dünnschicht-chromatographisch, ^1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopisch belegt. Die ^{13}C -NMR-Daten sind im experimentellen Teil sowie im Anhang unter Abbildung 34 zu finden

4.2.2.3.3.2 ^1H -NMR-Daten des 3-Benzyloxy-2-nitro-benzoesäurebenzylesters (**98**)

Aus dem ^1H -NMR des 3-Benzyloxy-2-nitro-benzoesäurebenzylester **98**, Abbildung 4.2.25, ist deutlich erkennbar, dass die Benzylierung an der Säurefunktion, sowie an der Hydroxy-Gruppe der Ausgangsverbindung, der 3-Hydroxy-2-nitro-benzoesäure **97**, stattgefunden hat.

Als Beweis der doppelten Benzylierung ist das Signal bei $\delta = 5,32$ ppm zu sehen, dessen Integration im Verhältnis zu den Signalen der aromatischen Protonen H-4, H-5 und H-6 vier H-Protonen ergibt. Die Integration der Signale der aromatischen Protonen der Benzyl-Gruppe ergibt zehn H-Protonen, was die doppelte Benzylierung bestätigt.

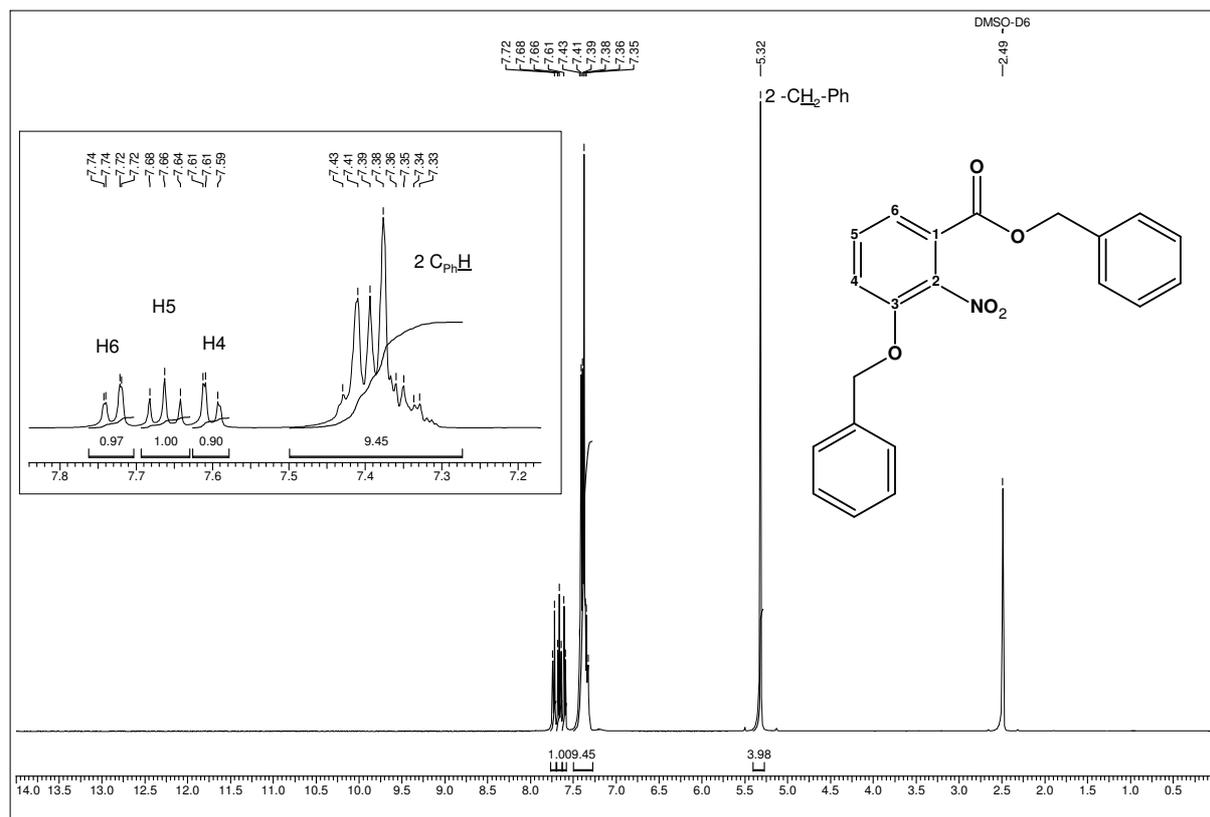


Abbildung 4.2.25: ^1H -NMR-Spektrum von 3-Benzyloxy-2-nitro-benzoesäurebenzylester **98** (DMSO- d_6 , $\delta = 2,49$ ppm)

Die Signale der verbleibenden drei aromatischen Protonen H-4, H-5 und H-6 erfahren durch die Benzylierung im Vergleich zur Ausgangsverbindung **97** eine Tieffeldverschiebung. Das Signal von H-6 tritt mit einer Tieffeldverschiebung von $\Delta = + 0,35$ ppm, bei $\delta = 7,73$ ppm als Dublett ($^3J_{\text{H,H}} = 7,3$ Hz) in Resonanz. Das Triplet bei $\delta = 7,66$ ppm ($^3J_{\text{H,H}} = 8,1$ Hz) entspricht Proton H-5 und erfährt eine Tieffeldshift von $\Delta = + 0,20$ ppm. Proton H-4 tritt als Dublett ($^3J_{\text{H,H}} = 7,8$ Hz) bei $\delta = 7,60$ ppm in Resonanz. Die Tieffeldverschiebung im Vergleich zur Ausgangsverbindung **97** entspricht für H-4, $\Delta = + 0,31$ ppm.

4.2.2.3.4 Herstellung von 3-Benzyloxy-2-nitro-benzoesäure (**99**)

4.2.2.3.4.1 Synthese und Mechanismus

Für die weitere Synthese muss die Carbonsäure-Funktion durch Verseifung wieder freigesetzt werden. Hierzu wird 3-Benzyloxy-2-nitro-benzoesäurebenzylester **98** in Methanol gelöst und mit einer 2,5 N NaOH umgesetzt bis dünnschichtchromatographisch keine Ausgangsverbindung erkennbar ist. Nach leichtem Ansäuern pH 5, fällt 3-Benzyloxy-2-nitro-benzoesäure **99** aus. Die Ausbeute der Umsetzung betrug 85 %.

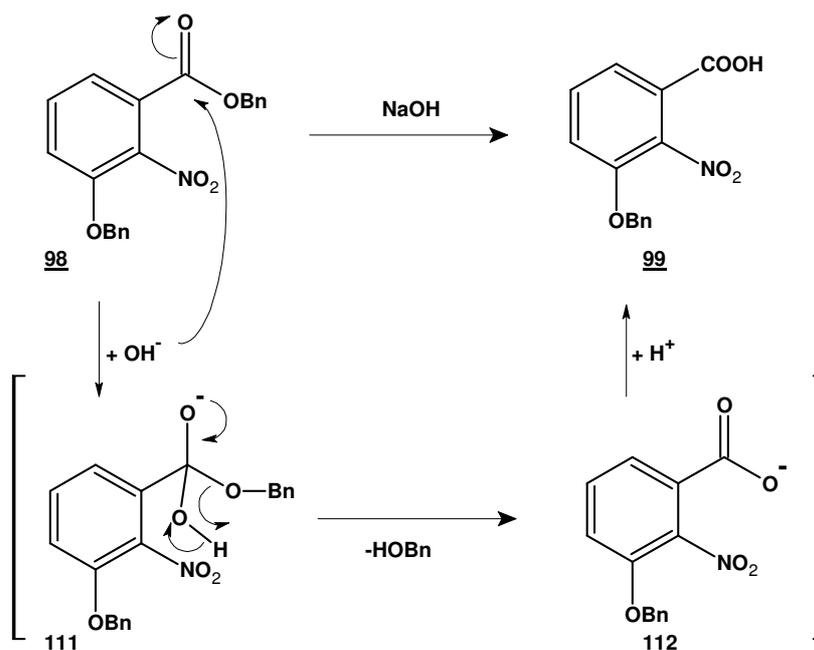


Abbildung 4.2.26: Synthese/Mechanismus zur Herstellung von 3-Benzyloxy-2-nitro-benzoesäure **99**

Durch die Verseifung mit NaOH bei Raumtemperatur ist sichergestellt, dass die Benzyl-Ether-Gruppe nicht angegriffen wird. Bei der Verseifung handelt es sich um eine nucleophile Additions-Eliminierungs-Reaktion bei der sich ein Hydroxid-Anion an den Carbonyl-Kohlenstoff der Carbonsäure addiert (**111**) und anschließend Benzylalkohol eliminiert (Abb. 4.2.26). Die Reinheit von **99** wurde ^1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopisch belegt. Im folgendem wird auf die ^1H -NMR-Daten näher eingegangen. Die ^{13}C -NMR-Daten sind im experimentellen Teil aufgelistet und im Anhang unter Abbildung 35 dargestellt.

4.2.2.3.4.2 ^1H -NMR-Daten des 3-Benzyloxy-2-nitro-benzoesäure (**99**)

Im ^1H -NMR der 3-Benzyloxy-2-nitro-benzoesäure **99** in Abbildung 4.2.27 tritt bei tiefem Feld, $\delta = 13,95$ ppm, das breite Singulett des H-Protons der Carboxy-Gruppe in Resonanz. Das unverändert bei $\delta = 7,42$ - $7,30$ ppm auftretende Multiplett (Integral 5), sowie das Singulett bei $\delta = 5,30$ ppm (Integral 2) belegen außerdem die Anwesenheit der Benzyl-Schutzgruppe in Position 3.

Die Signale der drei aromatischen Protonen H-4, H-5 und H-6 treten, im Vergleich zur Ausgangsverbindung **98** praktisch unverändert in Resonanz. Sämtliche Signale behalten ihr Kopplungsmuster bei und erfahren eine leichte Hochfeldverschiebung im Vergleich zur Ausgangsverbindung **98**, von $\Delta = -0,07$ bis $-0,03$ ppm.

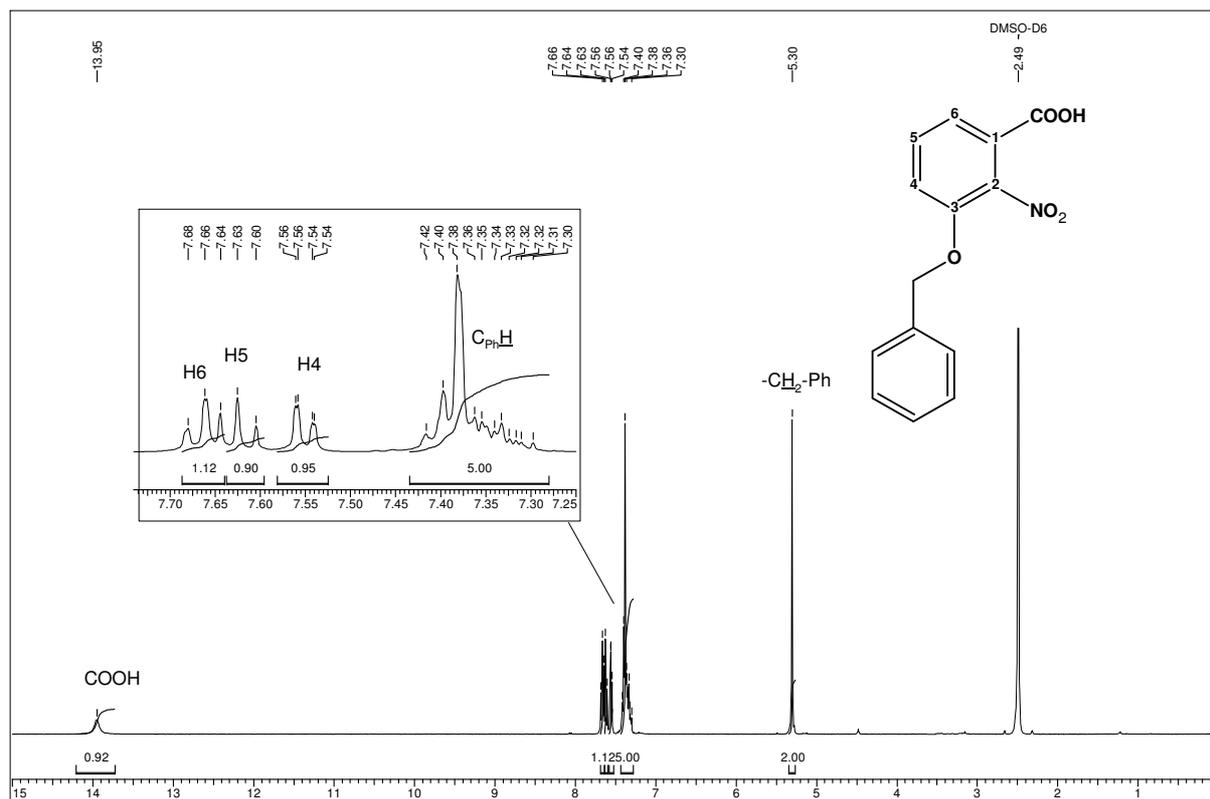


Abbildung 4.2.27: ^1H -NMR-Spektrum von 3-Benzyloxy-2-nitro-benzoessäure **99** (DMSO- d_6 , $\delta = 2,49$ ppm)

4.2.2.3.5 Herstellung von 2-Amino-3-benzyloxy-benzoessäure (**100**)

4.2.2.3.5.1 Synthese und Mechanismus

Zur Reduktion der Nitro-Gruppe von 3-Benzyloxy-2-nitro-benzoessäure **99** wird Natriumdithionit verwendet (Abb. 4.2.28). Der Vorteil besteht darin, dass nur die Nitro-Gruppe reduziert wird und die Carboxy-Gruppe unverändert bleibt.

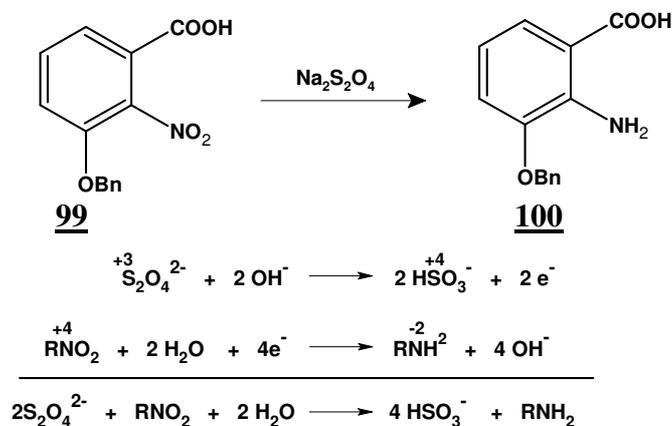


Abbildung 4.2.28: Redoxgleichung zur Herstellung der 2-Amino-3-benzyloxy-benzoessäure **100**

Nach Aufarbeitung erhält man farblose 2-Amino-3-benzyloxy-benzoesäure **100**. Die Aubeute betrug 71 %. Die Identität wurde auch hier ^1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopisch belegt. Die ^{13}C -NMR-Daten sind im experimentellen Teil aufgelistet und das zugehörige Spektrum im Anhang unter Abbildung 36 dargestellt.

4.2.2.3.5.2 ^1H -NMR-Daten der 2-Amino-3-benzyloxy-benzoesäure (**100**)

Im ^1H -NMR-Spektrum der 2-Amino-3-benzyloxy-benzoesäure **100** in Abbildung 4.2.29 erkennt man bei tiefem Feld, $\delta = 7,48 - 7,33$ ppm, die aromatischen H-Signale des AA'BB'C-Spinsystems der in Position 3 stehenden Benzyl-Schutzgruppe. Bei $\delta = 7,48$ ppm tritt als Dublett das H_b mit einer $^3J_{\text{H,H}}$ -Kopplung von 7,5 Hz, bei $\delta = 7,33$ ppm treten die Signale von H_d und H-6 ($^3J_{\text{H,H}} = 7,5$ Hz) als Dublett und bei $\delta = 7,39$ ppm die beiden H_c Atome als Triplett in Resonanz. Das Singulett der CH₂-Gruppe der Benzyl-Schutzgruppe tritt mit einer Integration von 2 H-Protonen bei $\delta = 5,13$ ppm in Resonanz.

Die Signale der H-Protonen in Position 4, 5 und 6 der Benzoesäure erfahren durch die Reduktion der Nitro-Gruppe zur Amino-Gruppe eine Hochfeldverschiebung. Durch den +M-Effekt der Amino-Gruppe wird die Elektronendichte im aromatischen System erhöht und die Protonen absorbieren bei höherem Feld. Der Effekt ist am stärksten für das zur Amino-Gruppe in *para*-Position stehende Proton H-5 zu beobachten. Es ist als Triplett bei $\delta = 6,47$ ppm ($^3J_{\text{H,H}} = 8,0$ Hz; $\Delta = -0,91$ ppm) zu erkennen. Das Signal von H-4 tritt als Dublett bei $\delta = 7,03$ ppm ($^3J_{\text{H,H}} = 7,8$ Hz; $\Delta = -0,52$ ppm) in Resonanz. Das Signal von Proton H-6 tritt bei gleicher chemischer Verschiebung wie das Signal von Proton H_d in Resonanz ($\Delta = -0,35$ ppm).

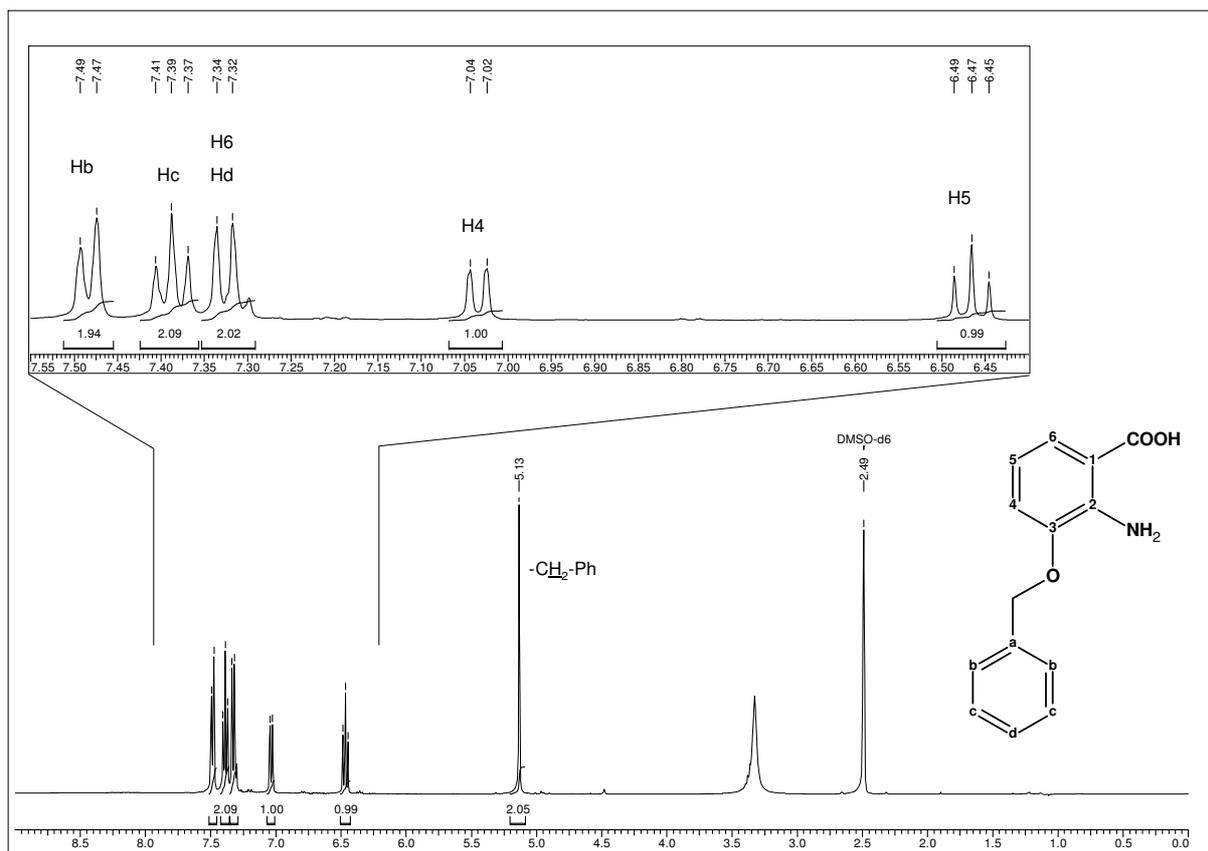


Abbildung 4.2.29: ^1H -NMR-Spektrum von 2-Amino-3-benzyloxybenzoesäure **100** (DMSO-d_6 , $\delta = 2,49$ ppm)

4.2.2.3.6 Herstellung von 3-Benzyloxy-anthranilsäure-formalid (**101**)

4.2.2.3.6.1 Synthese und Mechanismus

Die Reaktion von 2-Amino-3-benzyloxybenzoesäure **100** mit Formaldehyd führt zum Formalid **101**.

Dabei kann als erster Reaktionsschritt die Kondensation der Amino-Gruppe mit der Aldehyd-Funktion angenommen werden, wobei die entstandene Schiff'sche Base **114** sofort mit der *ortho*-ständigen Säurefunktion abreagiert, wie es in Abbildung 4.2.30 gezeigt ist.

Die Identität des 3-Benzyloxy-anthranilsäure-formalids (**101**) wurde ^1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopisch belegt. Die ^1H -NMR-Daten sind im experimentellen Teil aufgelistet und das zugehörige Spektrum im Anhang unter Abbildung 37 dargestellt.

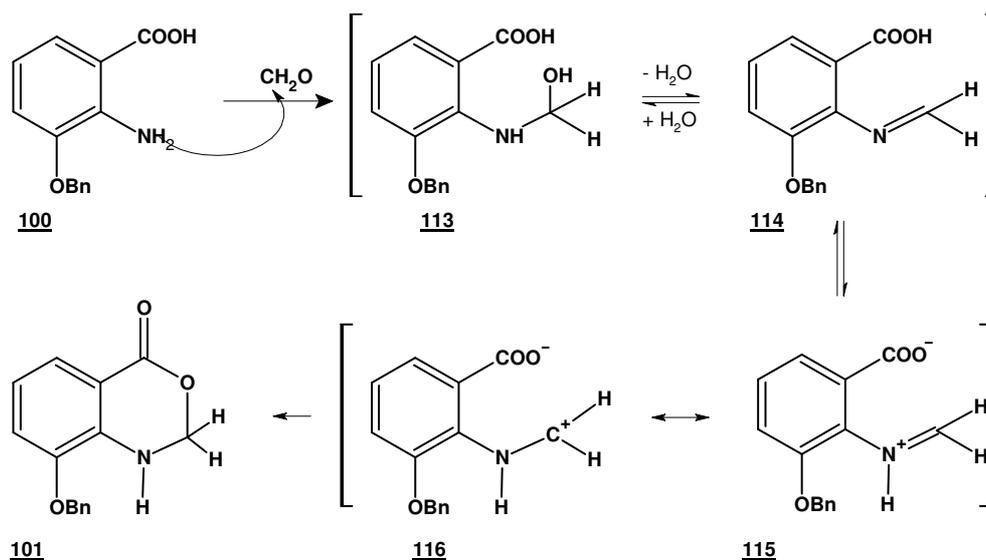


Abbildung 4.2.30: Synthese des 3-Benzyloxy-anthranilsäure-formalids **101**

4.2.2.3.6.2 ^{13}C -NMR-Daten des 3-Benzyloxy-anthranilsäure-formalids (**101**)

In Abbildung 4.2.31 ist das $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum des 3-Benzyloxy-anthranilsäure-formalids **101** dargestellt. Darüber hinaus ist in der Ausschnittsvergrößerung der Teil der aromatischen C-Signale mit dem entsprechendem ^{13}C -DEPT-NMR-Spektrum gegenübergestellt. Es zeigt, neben dem entkoppelten $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Gesamtspektrum, eine Ausschnittsvergrößerung des Resonanzbereichs $\delta = 115\text{-}135$ ppm überlagert mit dem zugehörigen ^{13}C -DEPT-Spektrums.

Bei hohem Feld, $\delta = 80 - 85$ ppm tritt, im Vergleich zur Ausgangsverbindung **100**, ein weiteres Signal in Resonanz. Bei den beiden Signalen handelt es sich um das C-Atom der benzylichen Methylen-Gruppe und das C-Atom der Formalid-Methylen-Gruppe die beide im ^{13}C -DEPT-Spektrum ein negatives Signal ergeben (nicht gezeigt). Letzteres erfährt im Vergleich mit anderen Methylen-C-Atomen durch die in α -Position stehende Carboxy-Gruppe (-M-Effekt) eine starke Tieffeldverschiebung wobei eine eindeutige Zuordnung der beiden Signale jedoch nicht möglich ist.

Die drei Signale bei $\delta = 124,7$ ppm, $\delta = 121,4$ ppm und $\delta = 118,0$ ppm sind, wie der Vergleich mit dem ^{13}C -DEPT-Spektrum zeigt, den aromatischen C-Atomen C-6, C-4 und C-5 zuzuordnen, die im Vergleich zur Ausgangsverbindung **100**, eine leichte Tieffeldverschiebung erfahren haben ($\Delta = 1,5\text{-}6,3$ ppm). Die verbleibenden drei Signale im Bereich von $\delta = 128,7 -$

128,1 ppm sind unverändert zur Ausgangsverbindung **100** und entsprechen den C-Atome der Benzyl-Schutzgruppe C-c, C-d und C-b.

Das Signal bei $\delta = 121,9$ ppm entspricht C-Atom C-1, was eine Tieffeldverschiebung von $\Delta = 11,9$ ppm im Vergleich zu **100** erfahren hat.

Ebenfalls treten die Signale der C-Atome C-2 und C-3, die direkt mit der NH- beziehungsweise mit der O-Benzyl-Gruppe verbunden sind, bei tiefem Feld in Resonanz. Das Signal von C-3 tritt bei $\delta = 150,2$ ppm in Resonanz, wobei jedoch eine eindeutige Zuordnung der Signale bei $\delta = 136,5$ und $135,6$ ppm für C_a und C-2 nicht möglich ist.

Das C-Atom der Carboxy-Gruppe tritt am weitesten tieffeldverschoben bei $\delta = 163,8$ ppm in Resonanz. Es erfährt, im Vergleich zu dem C-Atom der Carboxy-Gruppe von der Ausgangsverbindung **100**, eine für Carbonyl-C-Atome von Ester-Gruppen zu erwartende Hochfeldverschiebung von $\Delta = - 6,0$ ppm.

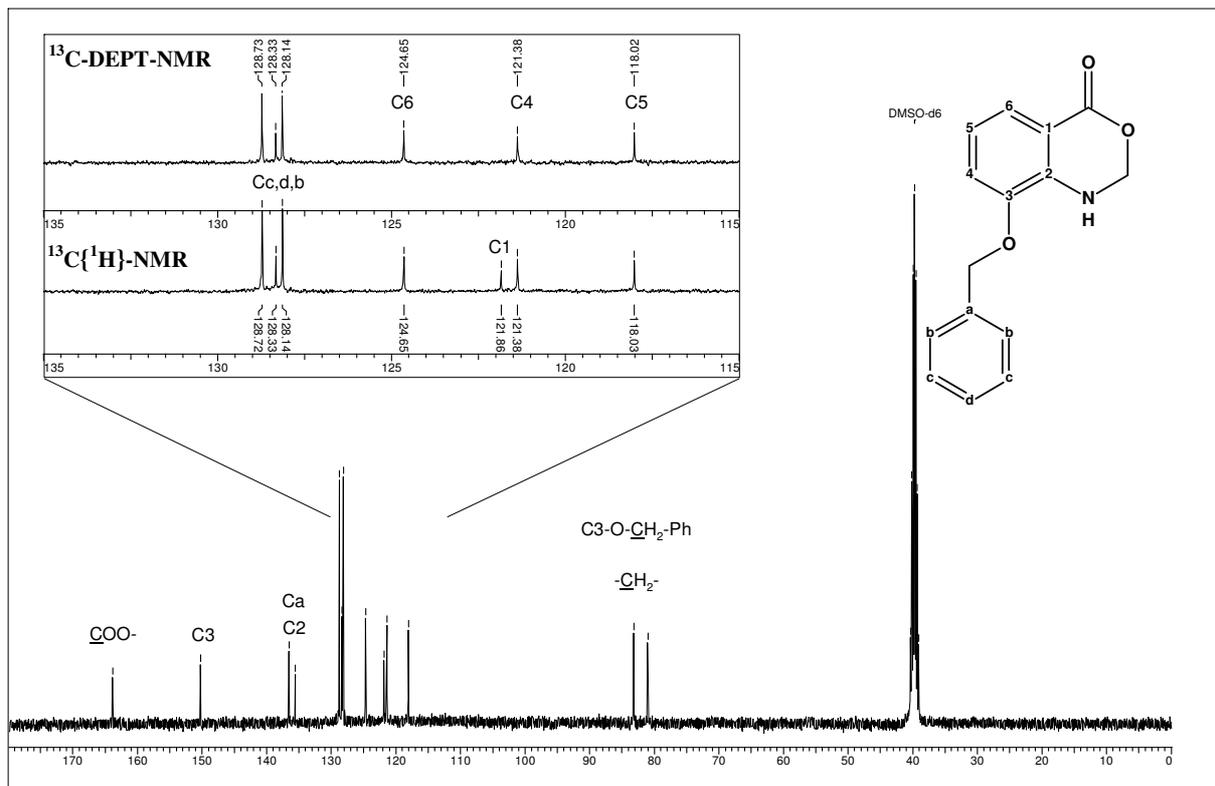


Abbildung 4.2.31: $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -Gesamtspektrum des 3-Benzyloxy-anthranilsäure-formalids **101** mit Teilbereichvergleich des $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ - und ^{13}C -DEPT-Spektrum (DMSO- d_6 , $\delta = 39,70$ ppm)

4.2.2.3.7 Herstellung von *N*-(2-Benzyloxy-6-carboxyphenyl)-glycin-nitril (**102**)

4.2.2.3.7.1 Synthese und Mechanismus

Der erhaltene 3-Benzyloxy-anthranilsäure-formalid **101** wird mittels Umsetzung mit Natriumcyanid zum *N*-(2-Benzyloxy-6-carboxyphenyl)-glycin-nitril **102** umgesetzt.

Der Mechanismus der Reaktion basiert auf dem Effekt der zwei elektronenziehenden Heteroatomen die das Methylen-C-Atom des Formalids für einen nucleophilen Angriff des Cyanid-Ions zugänglich machen und so eine Öffnung des Lactonrings verursacht (Abb. 4.2.32)

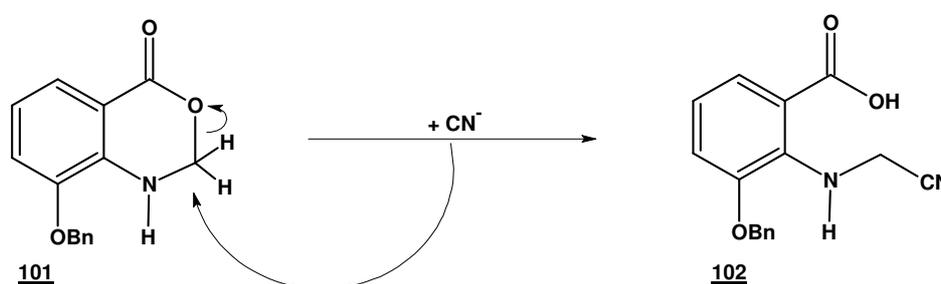


Abbildung 4.2.32: Synthese des *N*-(2-Benzyloxy-6-carboxyphenyl)-glycin-nitrils **102**

Die Ausbeute an *N*-(2-Benzyloxy-6-carboxyphenyl)-glycin-nitril **102** betrug nach Aufarbeitung 79 %. Die Identität wurde auch hier ^1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopisch belegt. Die ^{13}C -NMR-Daten sind im experimentellen Teil aufgelistet und das zugehörige Spektrum im Anhang unter Abbildung 38 dargestellt.

4.2.2.3.7.2 ^1H -NMR-Daten des *N*-(2-Benzyloxy-6-carboxyphenyl)-glycin-nitrils (**102**)

Im ^1H -NMR des *N*-(2-Benzyloxy-6-carboxyphenyl)-glycin-nitrils **102** in Abbildung 4.2.33 erkennt man bei charakteristisch tiefem Feld das H-Protonen der Carboxy-Gruppe ($\delta = 13,19$ ppm) als breites Singulett. Ein weiteres verbreitertes Singulett tritt bei $\delta = 7,70$ ppm in Resonanz was dem NH-Proton zugeordnet wird.

Die aromatischen H-Protonen der Benzyl-Gruppe treten als Multipletts bei $\delta = 7,51$ bis $7,48$ ppm (Integration 3) und $\delta = 7,42$ bis $7,38$ ppm (Integration 2) in Resonanz. Im Vergleich zu der Ausgangsverbindung, dem 3-Benzyloxy-anthranilsäure-formalids **101**, erfahren die Signale der aromatischen Protonen H-3, H-4 sowie H-5 eine leichte Verschiebung zu höherem Feld ($\Delta = -0,28$ bis $-0,12$ ppm). Das Signal des Protons H-5 tritt mit einer $^3J_{\text{H,H}}$

Kopplungskonstante von 7,0 Hz als Dublett bei $\delta = 7,34$ ppm und Proton H-3 als Dublett ($^3J_{H,H} = 7,9$ Hz) bei $\delta = 7,26$ ppm in Resonanz. Das Triplet von Proton H-4 ist um $\Delta = -0,28$ ppm hochfeldverschoben und erscheint bei $\delta = 6,85$ ppm ($^3J_{H,H} = 7,0$ Hz). Das Singulett der Methylen-Protonen der Benzyl-Gruppe erscheint unverändert zur Ausgangsverbindung **101** bei $\delta = 5,16$ ppm. Die Protonen der Methylen-Gruppe des Glycins treten bei $\delta = 4,44$ ppm als Singulett in Resonanz. Sie erfahren eine Hochfeldverschiebung von $\Delta = -0,87$ ppm.

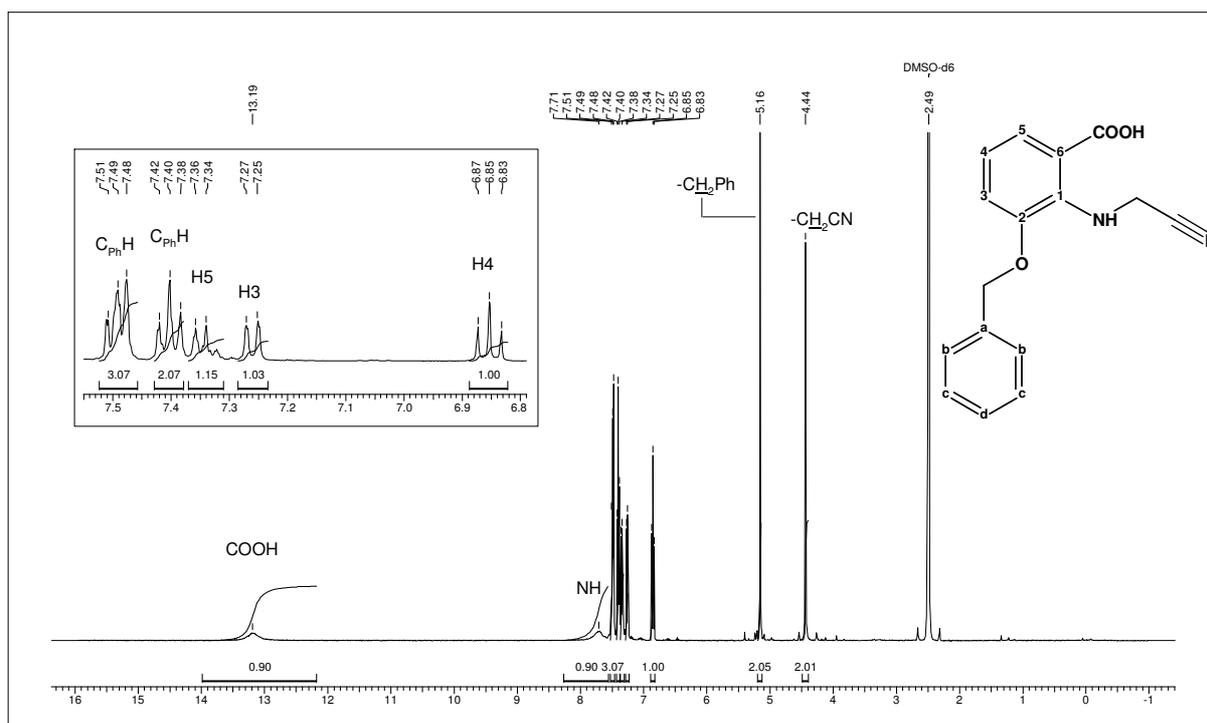


Abbildung 4.2.33: ^1H -NMR-Spektrum vom *N*-(2-Benzyloxy-6-carboxyphenyl)-glycin-nitril **102** (DMSO- d_6 , $\delta = 2,49$ ppm)

4.2.2.3.8 Herstellung von *N*-(2-Benzyloxy-6-carboxyphenyl)-glycin (**103**)

4.2.2.3.8.1 Synthese und Mechanismus

N-(2-Benzyloxy-6-carboxyphenyl)-glycin-nitril **102** wird in einer basenkatalysierten Hydrolyse mittels NaOH in *N*-(2-Benzyloxy-6-carboxyphenyl)-glycin **103** überführt. *N*-(2-Benzyloxy-6-carboxyphenyl)-glycin **103** bildet farblose Kristalle und wird in einer Ausbeute von 79% erhalten.

Den Mechanismus kann man sich wie folgt erklären: Durch sukzessiven nucleophilen Angriff des Hydroxid-Anions am Kohlenstoff-Atom C* (**102**, s. Abb. 4.2.34) entsteht nach Protonierung und Hydrolyse die Säurefunktion **103**.

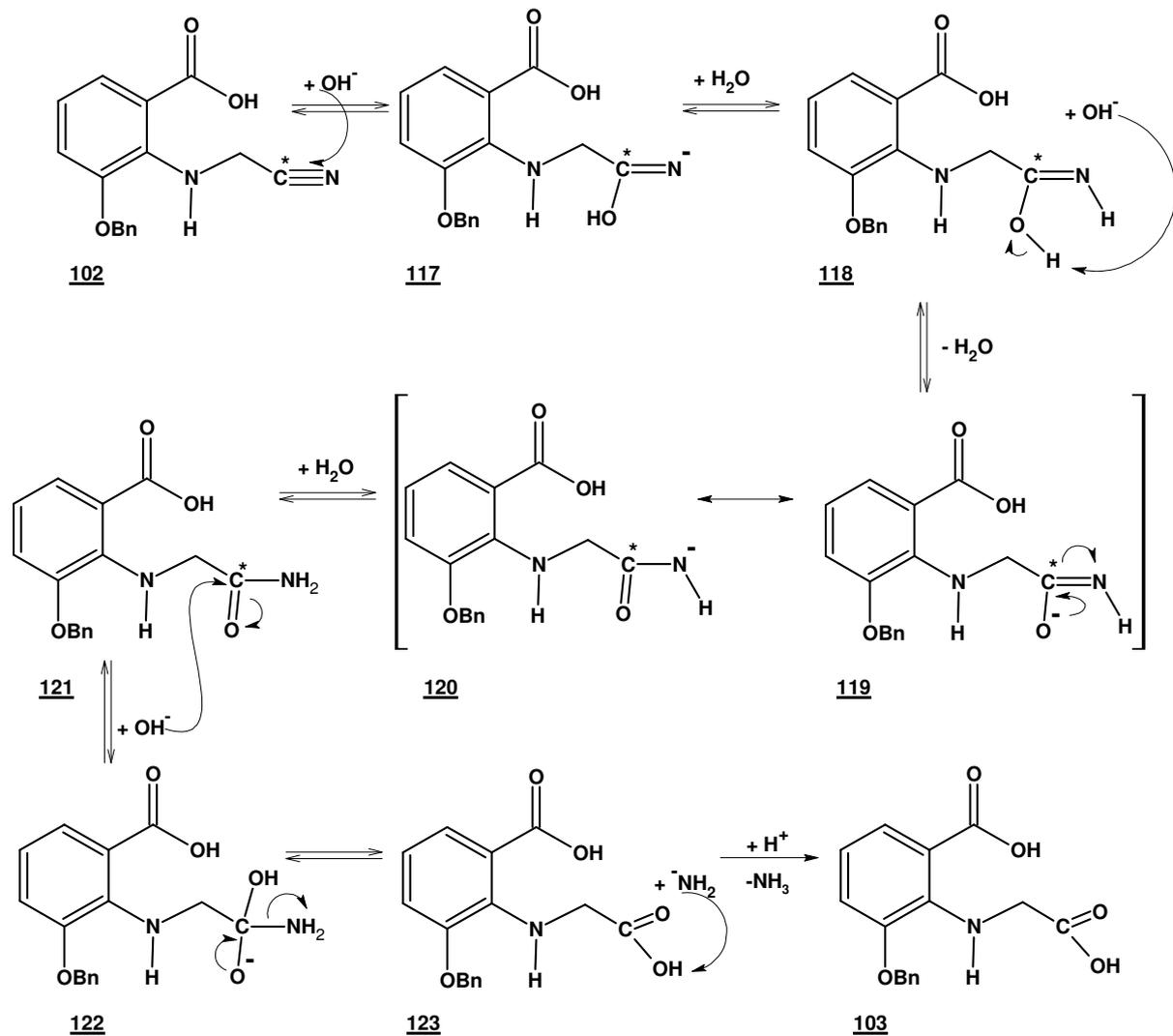


Abbildung 4.2.34: Mechanismus der basischen Hydrolyse von N-(2-Benzyloxy-6-carboxyphenyl)-glycin-nitril **103**

Die Identität von **103** ist ^1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopisch belegt. Die ^{13}C -NMR-Daten sind im experimentellen Teil aufgelistet und das zugehörige Spektrum im Anhang unter Abbildung 39 dargestellt

4.2.2.3.8.2 ^1H -NMR-Daten des N-(2-Benzyloxy-6-carboxyphenyl)-glycins (**103**)

Im ^1H -NMR-Spektrum des N-(2-Benzyloxy-6-carboxyphenyl)-glycins **103** in Abbildung 4.2.35 tritt bei tiefem Feld, ein breites Singulett ($\delta = 12,75$ ppm, 2H) in Resonanz. Es ist den H-Protonen der beiden Carboxy-Gruppen zuzuordnen.

Das Signal der Methylen-Protonen des Glycins ist zu höherem Feld verschoben. Es tritt nunmehr bei $\delta = 4,14$ ppm in Resonanz ($\Delta = - 0,3$ ppm).

Die Signale der Protonen H-3 und H-4 sind als Dublett bzw., Triplet bei $\delta = 7,10$ ppm (H-3) sowie $\delta = 6,62$ ppm (H-4) ebenfalls leicht zu höherem Feld verschoben ($\Delta = - 0,2$ ppm).

Unverändert zur Ausgangsverbindung **102** treten die Signale der Protonen der Benzyl-Gruppe in Resonanz. Die Phenyl-Protonen treten gemeinsam mit dem Proton H-5 als Multipllett in einem Bereich von $\delta = 7,46$ bis 7,33 ppm in Resonanz und das Singulett der Methylen-Protonen der Benzyl-Gruppe erscheint unverändert zur Ausgangsverbindung **102** bei $\delta = 5,1$ ppm.

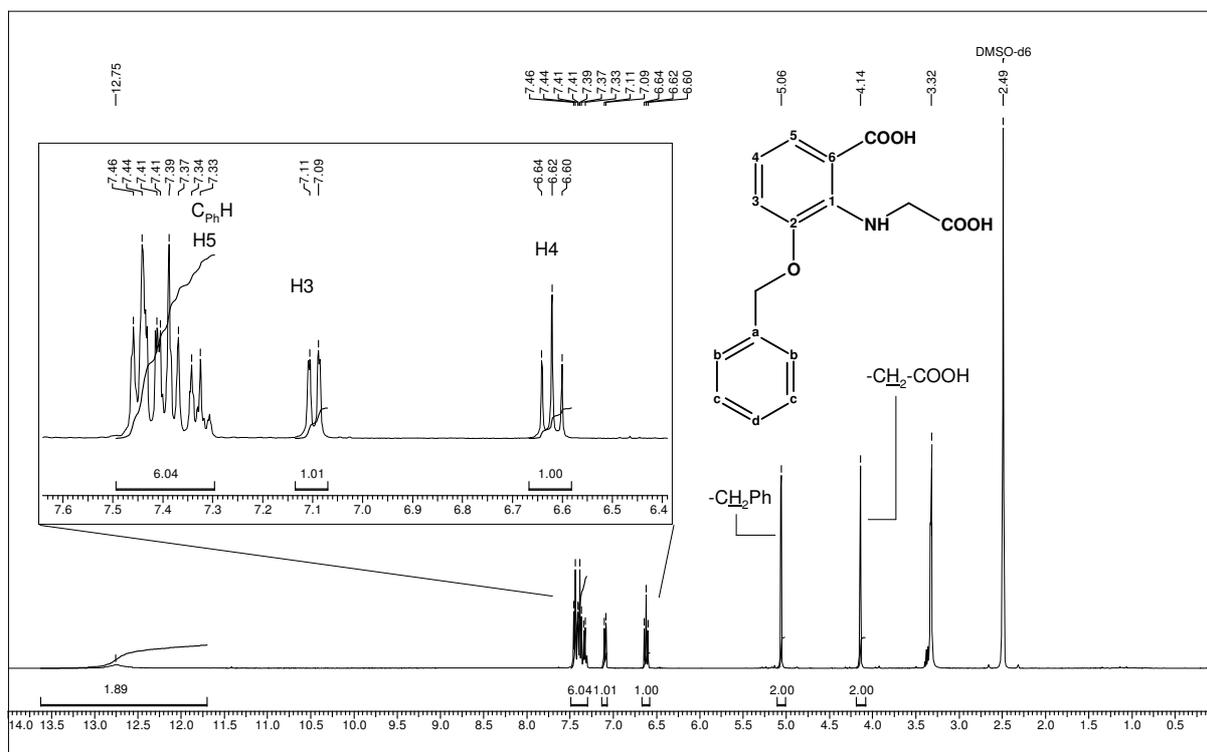


Abbildung 4.2.35: ¹H-NMR-Spektrum des *N*-(2-Benzyloxy-6-carboxyphenyl)-glycins **103** (DMSO-d₆, $\delta = 2,49$ ppm)

4.2.2.3.9 Herstellung von 1,3-Diacetyl-7-benzyloxy-indoxyl (**104**)

4.2.2.3.9.1 Synthese und Mechanismus

Zur Herstellung des 1,3-Diacetyl-7-benzyloxy-indoxyl **104** wird *N*-(2-Benzyloxy-6-carboxyphenyl)-glycins **103** in Acetanhydrid und Natriumacetat umgesetzt. Der Mechanismus der Ringschlussreaktion ist folgendermaßen erklärbar:

N-(2-Benzyloxy-6-carboxyphenyl)-glycin **103** wird mit Acetanhydrid doppelt acetyliert (Abb. 4.2.36). Das gemischte Anhydrid **124** wird anschließend an der Methyleninheit mit Acetat

deprotoniert, wobei intermediär ein Carbanion **125** angenommen wird, dessen freies Elektronenpaar das Carbonyl-C-Atom des gemischten Anhydrids in *ortho*-Position zum Stickstoff angreift. Nach gleichzeitiger Abspaltung eines Acetat-Restes entsteht ein energetisch günstiger Fünfring **126**. Anschließende Abspaltung von CO₂ bewirkt eine Aromatisierung des entstandenen Fünfringes **104**.

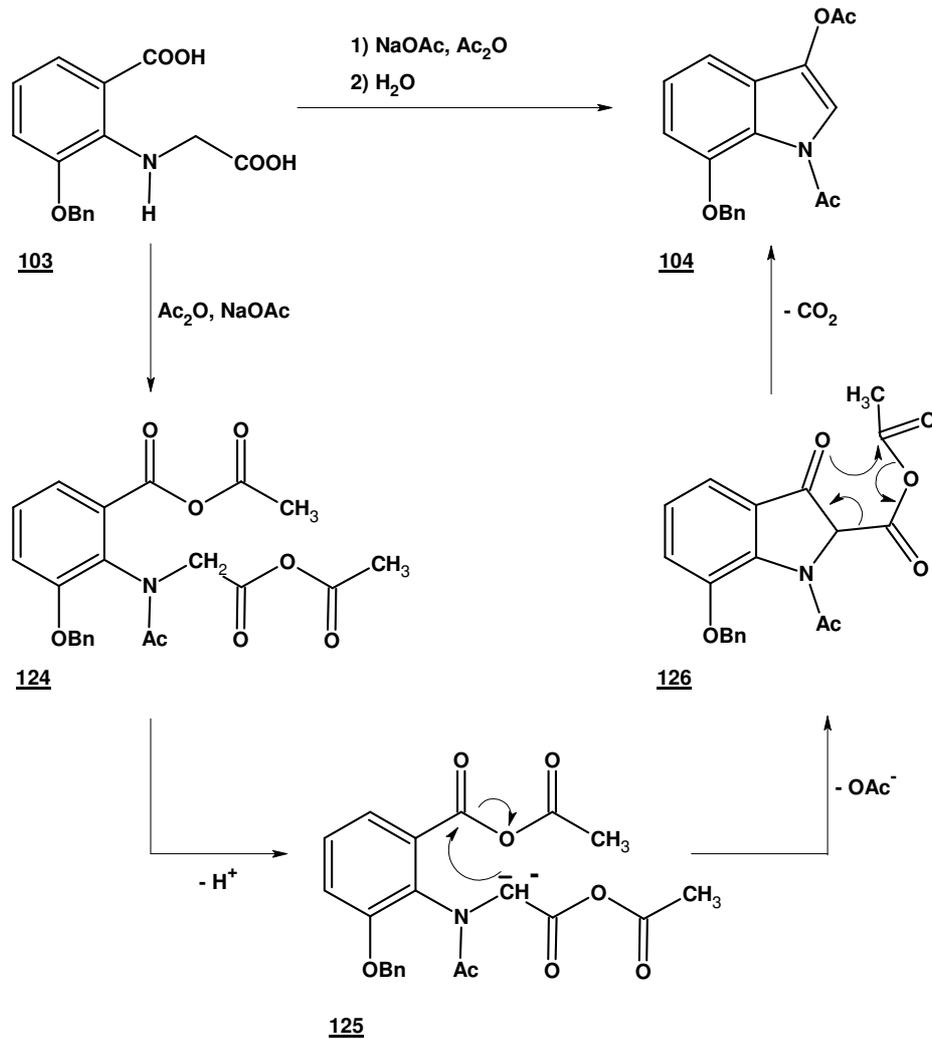


Abbildung 4.2.36: Mechanismus zur Herstellung von 1,3-Diacetyl-7-benzyloxy-indoxyl **104**

4.2.2.3.9.2 $^1\text{H-NMR}$ -Daten des 1,3-Diacetyl-7-benzyloxy-indoxyls (**104**)

In Abbildung 4.2.37 ist das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des 1,3-Diacetyl-7-benzyloxy-indoxyls **104** mit einer Vergrößerung des aromatischen Bereichs dargestellt.

Bei tiefem Feld, $\delta = 7,82$ ppm, tritt das H-2 Proton als Singulett in Resonanz. Als weitere charakteristische Signale für den Ringschluss zum 1,3-Diacetyl-7-benzyloxy-indoxyl **104** sind bei hohem Feld zwei Singulett bei $\delta = 2,60$ und $2,37$ ppm zu erkennen. Sie ergeben jeweils eine Integration von 3 H-Protonen und entsprechen den Protonen der beiden Methylgruppen der Acetyl-Funktionen.

Im aromatischen Bereich treten, im Vergleich zur Ausgangsverbindung **103**, die Protonen der 5 Phenyl-Protonen der Benzyl-Gruppe unverändert als Multipllett in einem Bereich von $\delta = 7,45$ bis $7,37$ ppm in Resonanz. Zusätzlich zu dem Multipllett erkennt man noch ein Triplett bei $\delta = 7,26$ ppm ($^3J_{\text{H,H}} = 7,78$ Hz, 1H), ein Dublett bei $\delta = 7,18$ ppm ($^3J_{\text{H,H}} = 7,8$ Hz, 1H) und ein Dublett bei $\delta = 7,12$ ppm ($^3J_{\text{H,H}} = 7,92$ Hz, 1H) die den Protonen H-5, H-4 und H-6 zuzuordnen sind. Bei $\delta = 5,32$ ppm tritt das Singulett der zwei 2 H-Protonen der Methylen-Protonen der Benzyl-Gruppe in Resonanz.

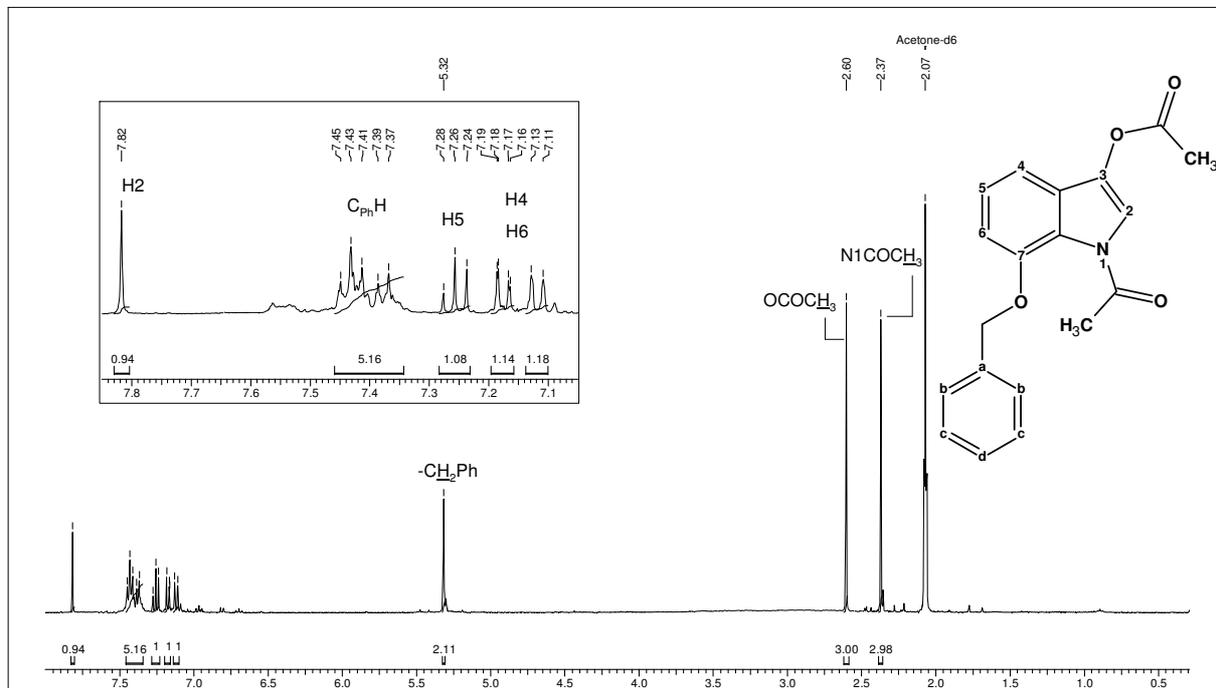


Abbildung 4.2.37: $^1\text{H-NMR}$ des 1,3-Diacetyl-7-benzyloxy-indoxyls **104** (Aceton- d_6 , $\delta = 2,07$ ppm)

4.2.2.4 Herstellung von *N*-Acetyl-7-benzyloxy-indolin-3-on (106)

4.2.2.4.1 Synthese und Mechanismus

N-Acetyl-7-benzyloxy-indolin-3-on 106 wird mittels Natriumsulfit durch basische Hydrolyse von 1,3-Diacetyl-7-benzyloxy-indoxyls 104 erhalten.

Die Reaktion findet in wässrigem Ethanol statt, so dass als angreifendes Teilchen ein Hydroxid-Anion betrachtet werden kann (Abb. 4.2.38). Der Reaktionsmechanismus entspricht einem Additions-Eliminierungs-Mechanismus, wobei das Hydroxid-Anion am Carbonyl-Kohlenstoff des Esters angreift (Carbonyl-Kohlenstoff des Amids ist weniger positiviert) und gleichzeitig die Abspaltung von dem entsprechenden Alkoholat bewirkt. Bei dem gebildeten Alkoholat 106b ist ein Tautomerengemisch (Keto-Enol-Tautomerie) von *N*-Acetyl-7-benzyloxy-indolin-3-on 106a und *N*-Acetyl-7-benzyloxy-indoxyl 106b denkbar. Im ¹H-NMR-Spektrum konnte bei Raumtemperatur nur das *N*-Acetyl-7-benzyloxy-indolin-3-on 106a = 106 nachgewiesen werden.

Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung erhält man *N*-Acetyl-7-benzyloxy-indolin-3-on 106 in 17%iger Ausbeute.

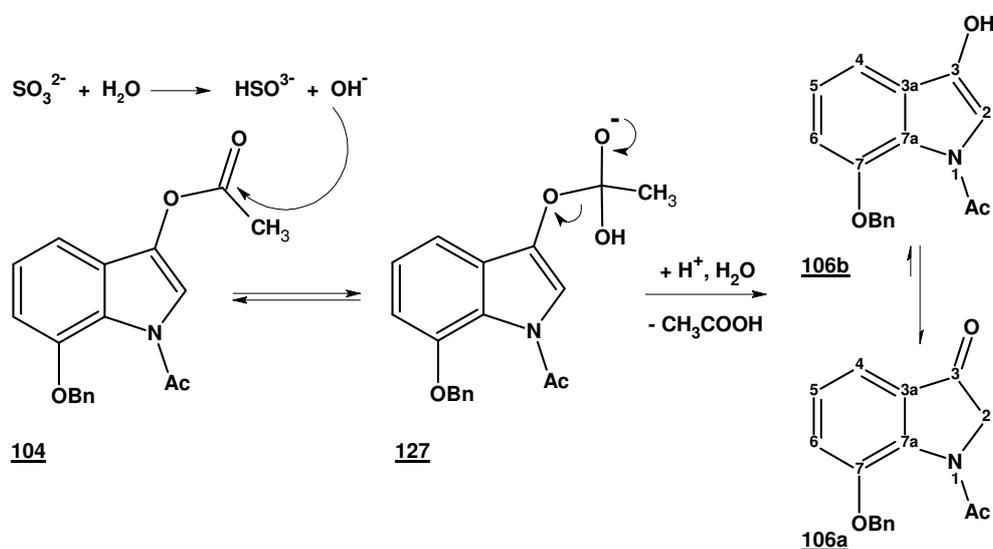


Abbildung 4.2.38: Basische Hydrolyse von 1,3-Diacetyl-7-benzyloxy-indoxyls 104 zu *N*-Acetyl-7-benzyloxy-indolin-3-on 106

4.2.2.4.2 ¹H-NMR-Daten des *N*-Acetyl-7-benzyloxy-indolin-3-on (106)

In Abbildung 4.2.39 ist das ¹H-NMR-Spektrum des *N*-Acetyl-7-benzyloxy-indolin-3-on 106 mit einer Vergrößerung des aromatischen Bereichs dargestellt.

In diesem Bereich sind 6 Signale mit einer Gesamtintegration von 8 Protonen zu erkennen. Sie entsprechen den 5 Protonen der Benzyl-Gruppe sowie den 3 Protonen H-4, H-5 und H-6. Unverändert zur Ausgangsverbindung **104** tritt Proton H-5 als Triplet bei $\delta = 7,26$ ppm ($^3J_{H,H} = 7,8$ Hz) in Resonanz. Das andere Triplet bei $\delta = 7,43$ ppm ($^3J_{H,H} = 7,3$ Hz) mit einer Integration von 2 H-Protonen entspricht den beiden chemisch äquivalenten Hc- und Hc'-Protonen. Das benzyliche Proton Hd tritt mit einer Integration von 1 H als Multiplett im Bereich von $\delta = 7,38 - 7,36$ ppm in Resonanz und das verbleibende Dublett (Integration 2) wird den beiden Protonen Hb und Hb' zugeordnet.

Die Protonen H-4 und H-6 ergeben beide ein Doppeldublett bei $\delta = 7,49$ und $7,31$ ppm mit einer $^3J_{H,H} = 7,7$ Hz und einer $^4J_{H,H} = 1,2$ Hz. Die Protonen der Methylene-Funktion der Benzyl-Gruppe treten als Singulett bei $\delta = 5,31$ ppm nahezu unverändert zur Ausgangsverbindung in Resonanz.

Als neues Signal im Vergleich zur Ausgangsverbindung **104** tritt bei $\delta = 4,42$ ppm ein Singulett (2 H) in Resonanz das den beiden Protonen in Position 2 zuzuordnen ist. Außerdem ist bei hohem Feld nur noch ein Singulett ($\delta = 2,27$ ppm; 3H) zu beobachten. Es entspricht den Methylprotonen der verbleibenden Acetyl-Funktion.

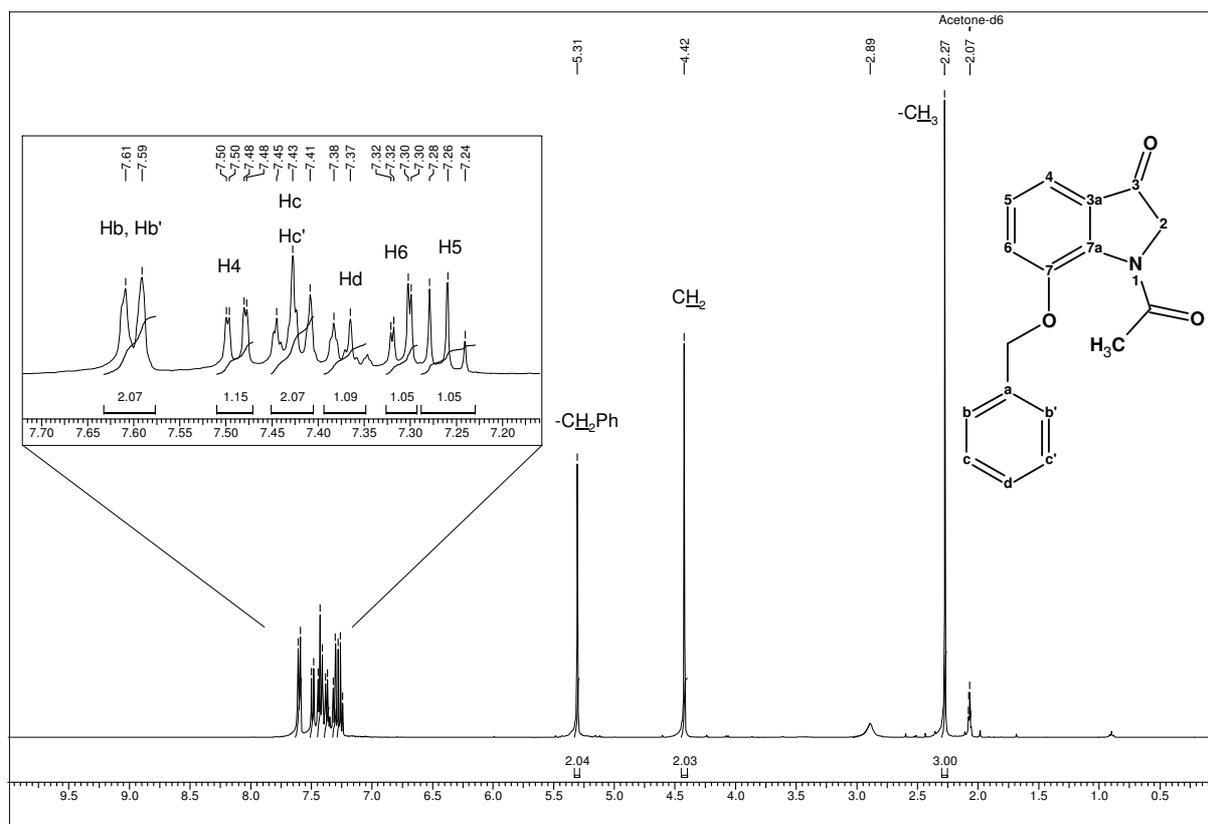


Abbildung 4.2.39: $^1\text{H-NMR}$ des 1-Acetyl-7-benzyloxy-indoxyls **106** (Aceton- d_6 , $\delta = 2,07$ ppm)

4.2.2.4.3 ^{13}C -NMR-Daten des *N*-Acetyl-7-benzyloxy-indoxyls (106)

Das $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ - überlagert mit dem ^{13}C -DEPT-Gesamtspektrum des *N*-Acetyl-7-benzyloxy-indoxyls **97** ist in Abbildung 4.2.40 dargestellt.

Im $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ - Spektrum sind bei tiefem Feld ($\delta = 196,9$ und $169,7\text{ppm}$) die Signale der beiden Carbonyl-C-Atome zu erkennen wobei das Signal des amidischen C-Atoms bei höherem Feld auftritt. Die vier aromatischen Signale im $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR, die im ^{13}C -DEPT-NMR nicht in Resonanz treten, entsprechen den C-Atomen C-7, Ca, C-3a und C-7a. Laut Inkrementberechnung werden die Signale bei tiefem Feld C-7 ($\delta = 150,3$ ppm) und Ca ($\delta = 144,8$ ppm) zugeordnet. Die Signale bei $\delta = 137,6$ ppm und $\delta = 130,1$ ppm entsprechen C-3a und C-7a.

Die drei Signale im Bereich $\delta = 129,3$ bis $128,7$ ppm treten als positive Signale im ^{13}C -DEPT-NMR in Resonanz. Es handelt sich um die aromatischen C-Atome der Benzyl-Gruppe. Die chemisch äquivalenten C-Atome Cb/Cb' und Cc/Cc' treten bei $\delta = 128,8$ ppm bzw. $\delta = 129,3$ ppm in Resonanz und Cd ist bei $\delta = 128,7$ ppm zu detektieren.

Die verbleibenden drei Signale, die sowohl im $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR sowie ^{13}C -DEPT-NMR auftreten, entsprechen den drei C-Atomen C-4 bis C-6. Laut Inkrementberechnung tritt das Signal von C-5 bei $\delta = 126,3$ ppm mit einer Kopplung von $^1J_{\text{C,H}} = 163$ Hz, C-4 bei $\delta = 121,8$ ppm mit einer Kopplung von $^1J_{\text{C,H}} = 159$ Hz und C-6 bei $\delta = 116,0$ ppm mit einer Kopplung von $^1J_{\text{C,H}} = 167$ Hz auf.

Die Signale der sekundären C-Atome C2 und des Methylen-C-Atoms der Benzyl-Gruppe treten bei $\delta = 71,8$ ppm und $\delta = 58,5$ ppm (C2) in Resonanz. Sie ergeben charakteristisch im ^{13}C -DEPT-NMR ein negatives Signal. Bei hohem Feld tritt das Signal des Methyl-C-Atoms der Acetyl-Gruppe bei $\delta = 24,4$ ppm in Resonanz.

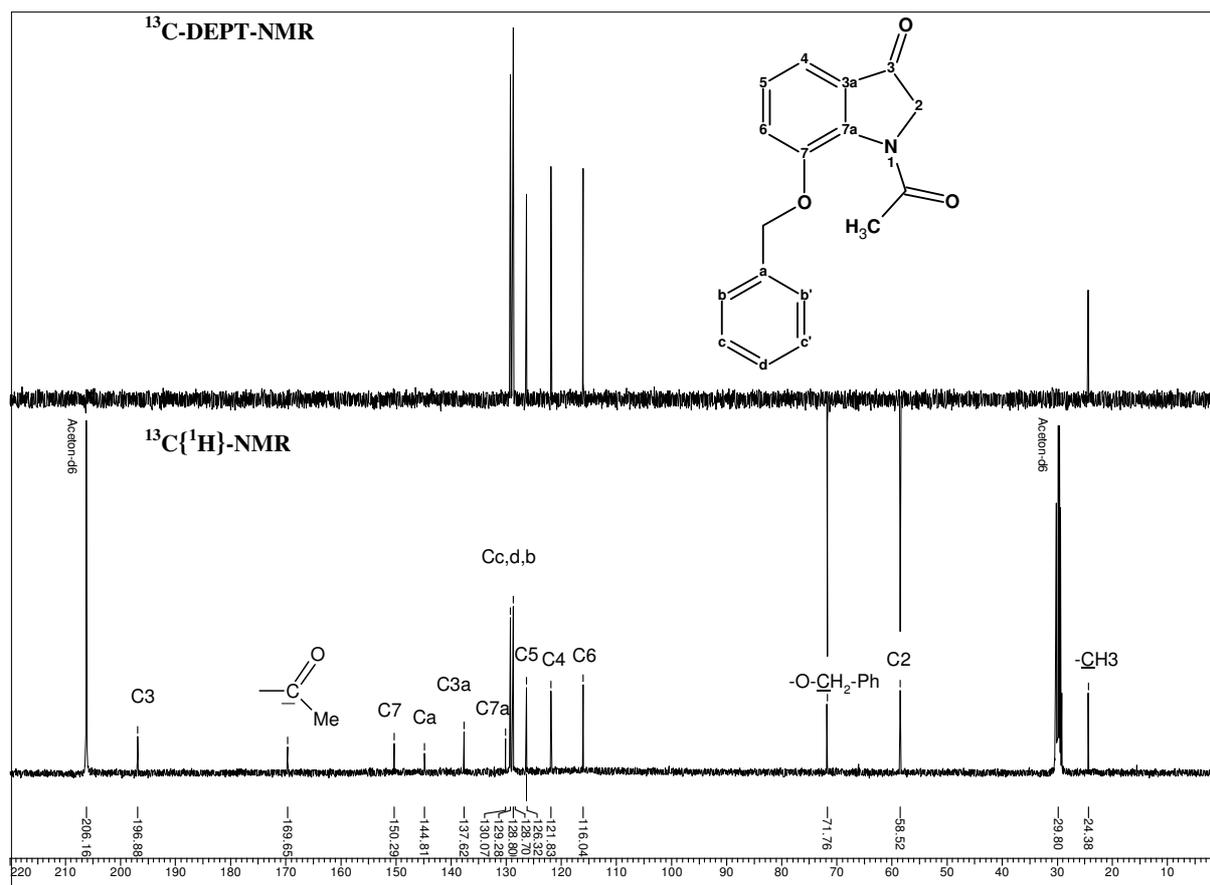


Abbildung 4.2.40: $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ - und ^{13}C -DEPT-Gesamtspektrum des 1-Acetyl-7-benzyloxy-indoxyls **106** (Aceton- d_6 , $\delta = 2,07$ ppm)

4.2.2.5 Herstellung von 6,7'-Dihydroxy-5-methyl-indirubin (**75**)

4.2.2.5.1 Synthesekonzept und Mechanismus

Die Herstellung des 6,7'-Dihydroxy-5-methyl-indirubin **75** erfolgt durch saure Kondensation von 6-Hydroxy-5-methyl-isatin **76** mit 1-Acetyl-7-benzyloxy-indoxyl **106**.

Der Mechanismus der Reaktion ist folgendermaßen erklärbar: Die sauren Reaktionsbedingungen erleichtern den Angriff der Enol-Doppelbindung am Isatin-Carbonyl-C-Atom, wobei die zentrale Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung im Indirubin-Molekül entsteht (Abb. 4.2.41). Anschließende Wasser- und Proton-Abspaltung führt zu 6,7'-Dihydroxy-5-methyl-indirubin **75**.

Vorteil dieser Reaktion ist, dass bei den eingesetzten Reaktionsbedingungen nicht nur die Kondensation zum Indirubin sondern auch die Entfernung / Hydrolyse der Benzyl- und Acetyl-Schutzgruppe gleichzeitig vollzogen wird.

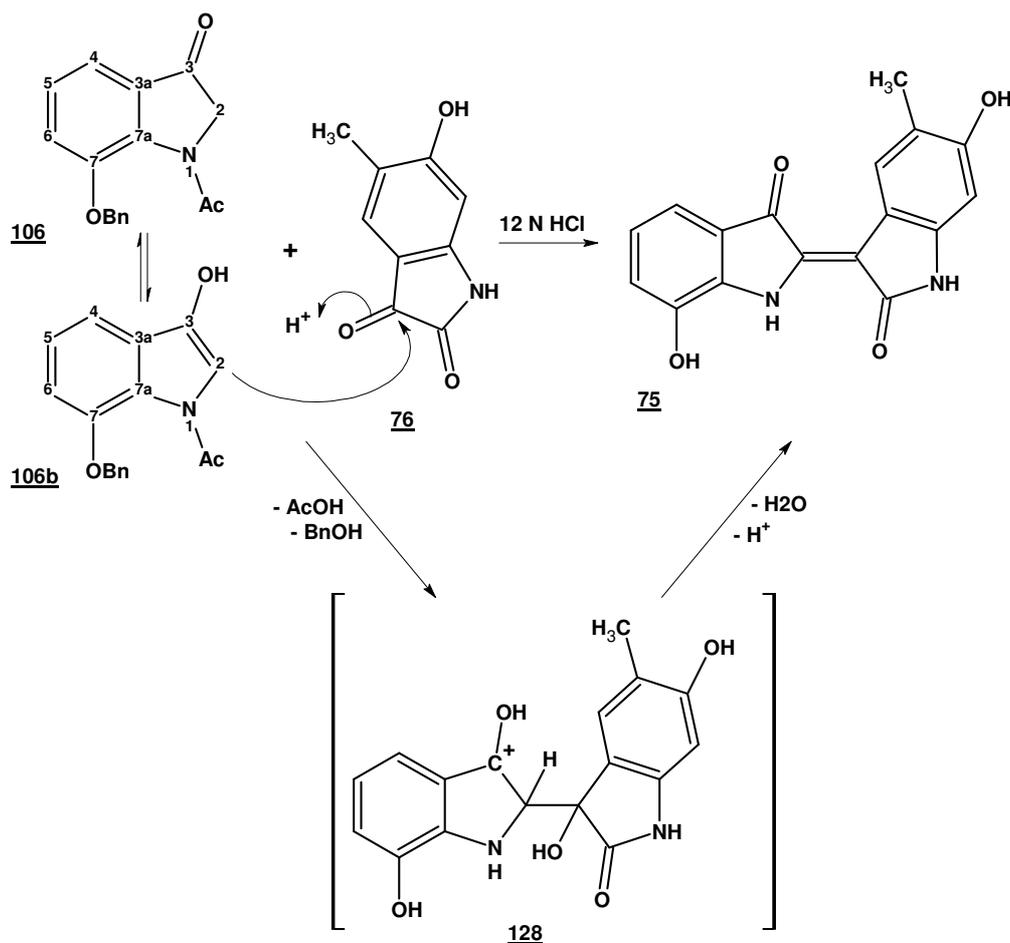


Abbildung 4.2.41: Reaktionsmechanismus zur Bildung von 6,7'-Dihydroxy-5-methyl-indirubin **75**

4.2.2.5.2 ¹H-NMR-Daten des 6,7'-Dihydroxy-5-methyl-indirubins (**75**)

Charakteristisch für Indirubin-Verbindungen treten bei tiefem Feld, $\delta = 10,69$ ppm und $10,62$ ppm, die Signale der beiden NH-Protonen jeweils als Singulett in Resonanz (Abb. 4.2.42). Aus der Integration geht hervor, dass unter dem Signal eines NH-Protons noch ein zusätzliches Proton in Resonanz tritt. Es handelt sich hierbei um das phenolische OH-Signal in Position 7' da das zweite OH-Signal (Position 6), im Vergleich zu der Monohydroxylierten Verbindung **74** (identische rechte Molekülhälfte) unverändert bei $\delta = 9,99$ ppm auftritt.

Aus dem gleichen Vergleich geht hervor, dass die drei Singulets bei $\delta = 8,54$ ppm; $6,43$ ppm und $2,11$ ppm unverändert zu den Signalen von 6-Hydroxy-5-methyl-indirubins **74** (s. Tab. 4.2.3) auftreten. Es handelt sich hierbei um die Signale der Protonen der rechten Molekülhälfte, die in beiden Molekülen (**74** u. **75**) identisch ist. Bei tiefem Feld, $\delta = 8,54$

ppm, tritt H-4, charakteristisch durch seine räumliche Nähe zu dem Carbonyl-Sauerstoff-Atoms in Position 3, in Resonanz. Das Signal von H-7, sowie das der Methyl-Protonen, tritt unverändert zu **74**, bei $\delta = 6,43$ ppm (H-7) und $\delta = 2,11$ ppm in Resonanz (s. Tab. 4.2.3, hellgrau unterlegt).

Die drei Signale im Bereich $\delta = 7,15$ bis $6,83$ ppm entsprechen den drei Protonen der linken (gestrichenen) Molekülhälfte wobei das Triplett bei $\delta = 6,85$ ppm H-5' entspricht ($^3J_{H,H} = 7,7$ Hz). Es erfährt auf Grund seiner *meta*-Position zur Hydroxy-Gruppe eine schwache Hochfeldverschiebung ($\Delta = -0,11$ ppm, s. Tab. 4.2.3, dunkelgrau unterlegt). Die verbleibende Dubletts (je $^3J_{H,H} = 7,7$ Hz) bei $\delta = 7,14$ ppm und $\delta = 7,01$ ppm entsprechen den Protonen H-6' und H-4'. Sie erfahren durch ihre *ortho*- bzw., *para*-Position zur Hydroxy-Gruppe eine Hochfeldverschiebung von $\Delta = -0,51$ ppm für H-6' und $\Delta = -0,46$ ppm für H-4'.

Tabelle 4.2.3: Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ Daten von 5-Methylindirubin **6**; 6-Hydroxy-5-methyl-indirubin **74** und 6,7'-Dihydroxy-5-methyl-indirubin **75** in δ [ppm].

	X ₁	X ₂	C ₄ H	C _{4'} H	C _{6'} H	C _{5'} H	C ₇ H	CH ₃
6	H	H	8,63	7,64	7,58	7,00	6,79	2,31
74	OH	H	8,58	7,60	7,52	6,96	6,42	2,11
75	OH	OH	8,54	7,14	7,01	6,85	6,43	2,11
Δ (75 zu 74)			-0,04	-0,46	-0,51	-0,11	0,01	0

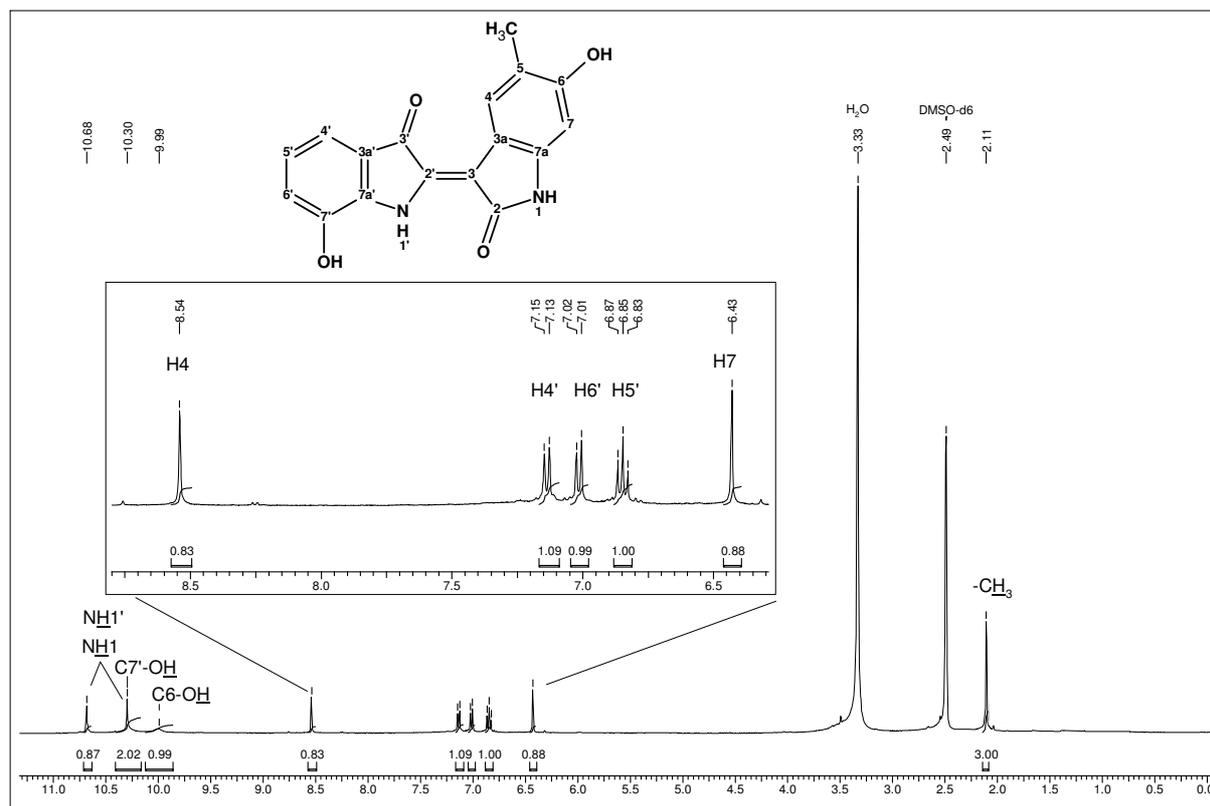


Abbildung 4.2.42: ^1H -NMR des 6,7'-Dihydroxy-5-methyl-indirubins **75** (DMSO- d_6 , $\delta = 2,49$ ppm)

4.2.2.5.3 ^{13}C -NMR-Daten des 6,7'-Dihydroxy-5-methyl-indirubins (**75**)

Aus dem in Abbildung 4.2.43 dargestellten Vergleich des $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR mit dem ^{13}C -DEPT-NMR-Spektrum gehen deutlich die Resonanzen der C-Atome der CH_3 - und CH-Gruppen hervor. Das Signal der CH_3 -Gruppe tritt bei charakteristischen $\delta = 16,3$ ppm und die Signale der CH-Gruppen treten im Bereich von $\delta = 97,5$ ppm bis $\delta = 127,8$ ppm in Resonanz. Bei tiefem Feld treten die beiden Carbonyl-C-Atome C-3' und C-2 in Resonanz ($\delta = 188,2$ ppm und $\delta = 172,3$ ppm) wobei das Signal bei tiefem Feld dem amidische Carbonyl-C-Atom C-2 entspricht.

Durch den Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten mit den Daten des 6-Hydroxy-5-methyl-indirubins **74** (Abb. 4.2.14) geht hervor, dass die Signale der C-Atome auf der rechten (ungestrichenen) Molekülhälfte beider Moleküle identisch sind (Tab. 4.2.4). Die Signale der C-Atome der Methin-Gruppe C-4 und C-7 treten in beiden Molekülen bei $\delta = 127,8$ ppm (C-4) und $\delta = 97,5$ ppm (C-7) in Resonanz. Unverändert zu **74** tritt C-6 bei $\delta = 158,0$ ppm, C-7a bei $\delta = 135,5$ ppm, C-5 bei $116,7$ ppm, C-3a bei $\delta = 113,0$ ppm und C-3 bei $\delta = 108,9$ ppm in Resonanz.

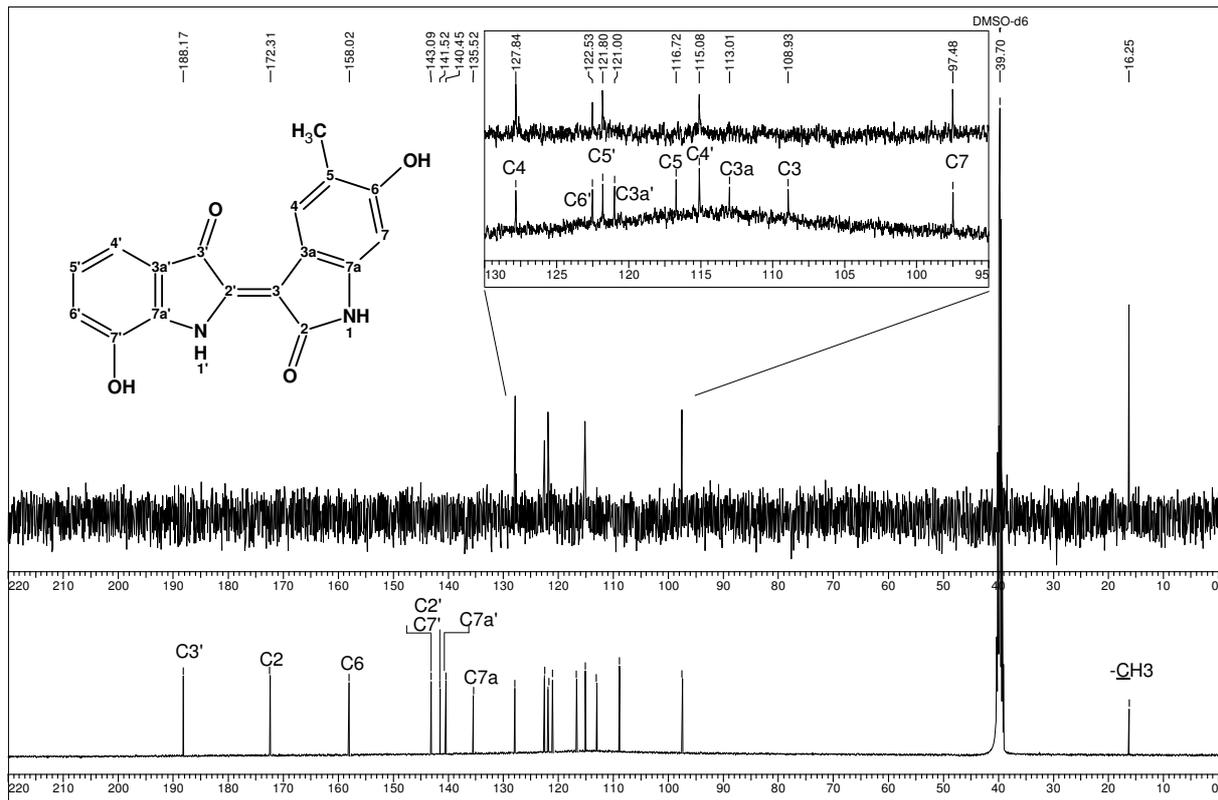


Abbildung 4.2.43: $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ - und ^{13}C -DEPT-Gesamtspektrum des 6,7'-Dihydroxy-5-methyl-indirubins **75** (DMSO- d_6 , $\delta = 39,70$ ppm)

Die verbleibenden Signale entsprechen den Resonanzen der C-Atome auf der linken (gestrichelten) Molekülhälfte. Bei tiefem Feld, $\delta = 143,1$ ppm und $\delta = 141,5$ ppm, treten die Signale von C-2' und C-7' in Resonanz. C-7' erfährt durch die Hydroxy-Gruppe eine starke Tieffeldverschiebung. Die Signale bei $\delta = 140,5$ ppm und $\delta = 121,0$ ppm entsprechen somit den verbleibenden C-Atomen C-7a' und C-3a'. Das Signal bei tieferem Feld ($\delta = 140,5$ ppm) ist dem aminischen C-Atom C-7a' zuzuordnen und das Signal bei $\delta = 121,0$ ppm ist C-Atom C-3a' zuzuordnen.

Die Methin-C-Atome C-4', C-5' und C-6' treten als positive Signale im ^{13}C -DEPT-NMR-Spektrum auf. Die Zuordnung der einzelnen Signale erfolgt mittels Inkrementabschätzung basierend auf den ^{13}C -NMR-Daten des 6-Hydroxy-5-methyl-indirubins **74**. Das Signal bei tiefem Feld, $\delta = 122,5$ ppm, entspricht C-Atom C-6', bei $\delta = 121,8$ ppm entspricht C-5' und das Signal bei $\delta = 115,1$ ppm entspricht C-Atom C-4'.

4.3 Vergleich der synthetisierten Metaboliten mit den aus Lebermikrosomen-Inkubationen isolierten Metaboliten

Der Nachweis, dass es sich bei den beiden synthetisierten Verbindungen 6-Hydroxy-5-methyl-indirubin **74** und 6,7'-Dihydroxy-5-methyl-indirubin **75** um die durch Lebermikrosomeninkubationen erzeugten Metaboliten (M2 und M3) handelt, erfolgt mittels Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Daten.

In Abbildung 4.3.1 ist das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der synthetisierten Verbindung 6-Hydroxy-5-methyl-indirubin **74** (schwarz) zusammen mit dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des isolierten Metaboliten M2 (rot) dargestellt. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der isolierten Verbindung M2 (rot) treten bei hohem Feld einige Verunreinigungen auf, die durch die Aufarbeitung von M2 aus den Inkubationsansätze stammen aber die charakteristischen Signale von M2 (aromatischer Bereich) nicht überlagern.

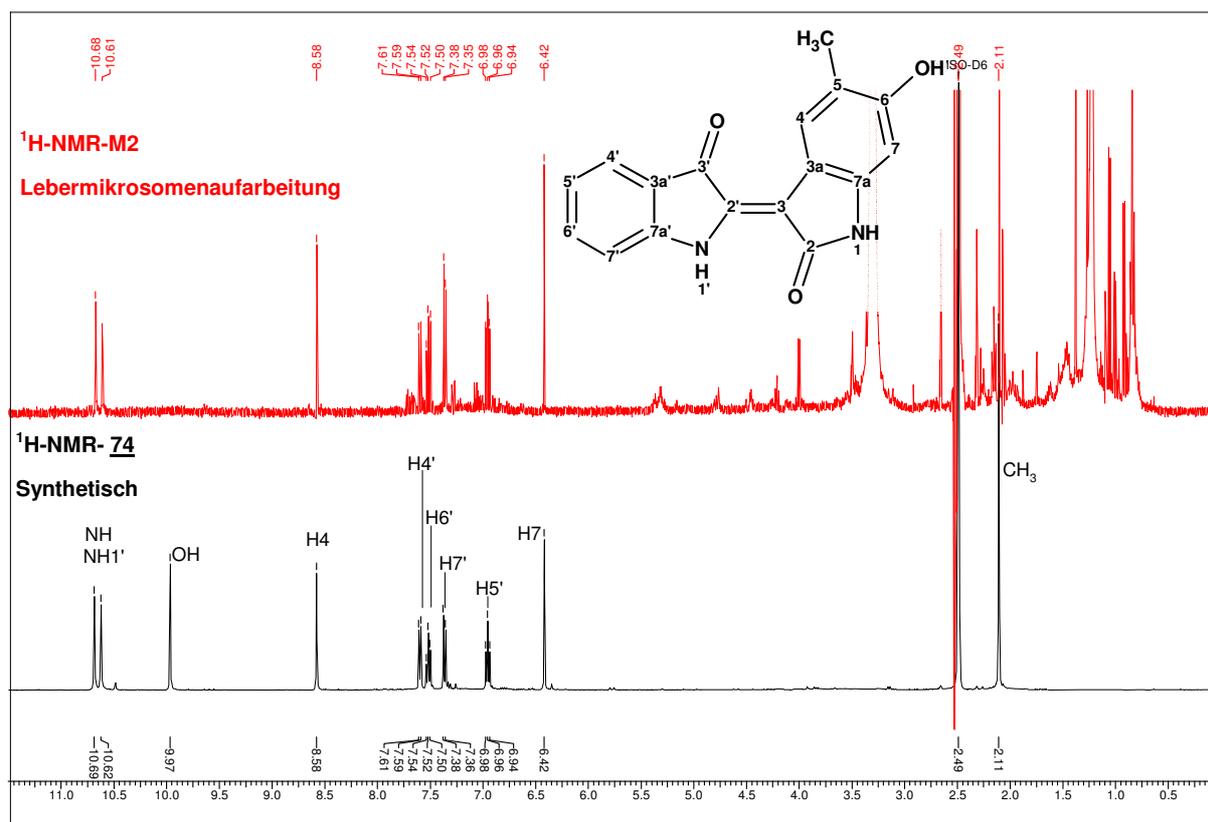


Abbildung 4.3.1: Übereinander abgebildete $^1\text{H-NMR}$ Spektren: Schwarz - Synthetisierte Verbindung **74**, rot – Isolierte Verbindung M2 aus der Inkubation von 5-Methylindirubin mit Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen

Aus dem Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Signalen im Bereich von $\delta = 6 - 11$ ppm (Abb. 4.3.1) geht deutlich eine Übereinstimmung der Signale beider Verbindungen hervor. Nur das phenolische OH-Signal bei $\delta = 9,97$ ppm im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der isolierten Verbindung ist nicht zu erkennen, was vermutlich auf den pH-Wert der NMR-Probe zurückzuführen ist. Bis auf kleine Verunreinigungen stimmen alle anderen Signale mit den Signalen der synthetisierten Verbindung (schwarz) überein. Somit handelt es sich bei M2 eindeutig um das 6-Hydroxy-5-methylindirubin **74** (Ausschnittsvergrößerung, s. Anhang, Abb. 40).

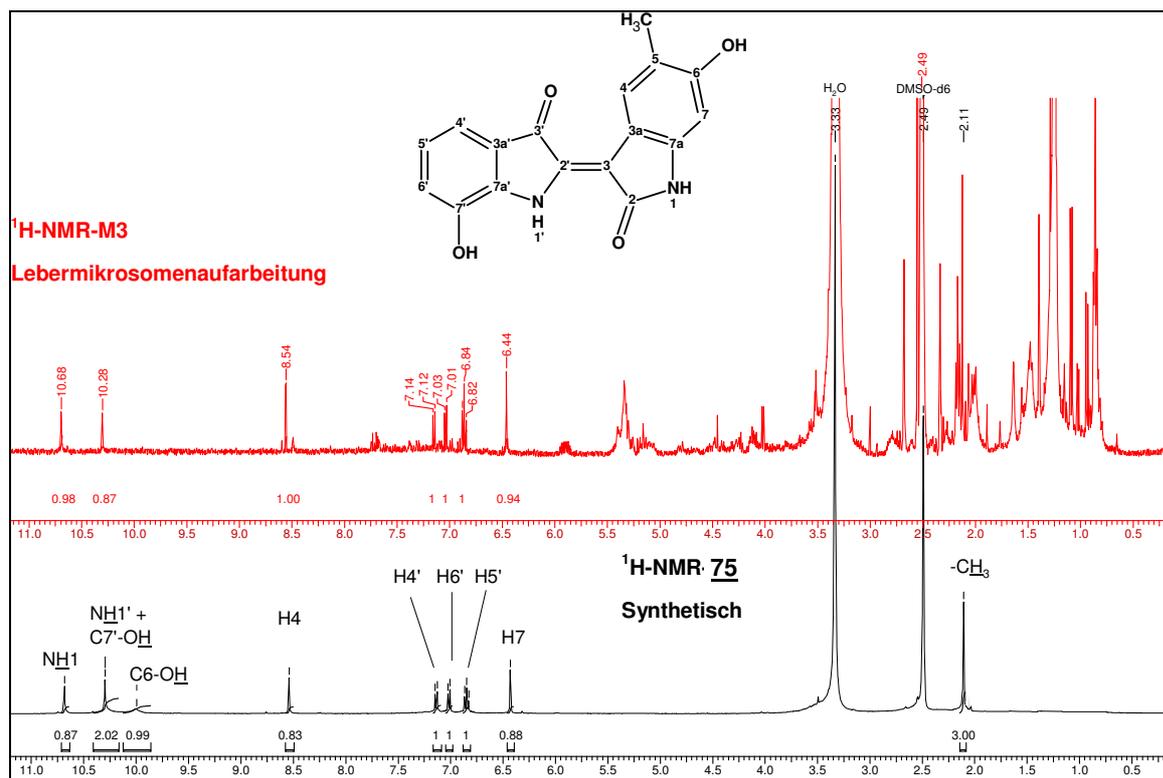


Abbildung 4.3.2: Übereinander abgebildete $^1\text{H-NMR}$ Spektren: Schwarz - Synthetisierte Verbindung **75**, rot – Isolierte Verbindung M3 aus der Inkubation von 5-Methylindirubin mit Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen

Aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des zweiten Metaboliten M3 (rot, Abb. 4.3.2) wurde wegen der Veränderung der Signale des gestrichenen Systems angenommen, dass eine weitere Hydroxygruppe zu M2 in Position 7' eingeführt wurde. Dies ging aus der Hochfeldverschiebung der verbleibenden drei statt vier Signale des gestrichenen Systems und aus dem veränderten Kopplungsmuster von H6' (pt \rightarrow pd) im Vergleich zu M2 hervor. Im $^1\text{H-NMR}$ von M3 sind wie bei M2, auf Grund des pH-Wertes, die Signale der OH-Gruppen nicht zu erkennen.

Der Nachweis, dass es sich bei der isolierten Verbindung M3 wirklich um das 6,7'-Dihydroxy-5-methyl-indirubin **75** handelt, liefert Abbildung 4.3.2. In dieser Abbildung entspricht das schwarze Spektrum der selbst synthetisierten und charakterisierten Verbindung 6,7'-Dihydroxy-5-methyl-indirubin **75** (Kap. 4.2.2.5), das rote Spektrum der isolierten Verbindung M3. Durch den Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Daten von **75** mit denen der isolierten Verbindung M3 geht hervor, dass die chemischen Verschiebungen und das Kopplungsmuster aller Signale (mit Ausnahme der phenolischen OH-Signale) beider Verbindungen identisch sind. Eine vergrößerte Darstellung des $^1\text{H-NMR}$ -Bereich $\delta = 6,3 - 8,8$ ppm ist im Anhang, Abbildung 41 abgebildet.

Des Weiteren ist durch ein Vergleich der Retentionszeiten der Verbindungen M2 mit **74** und M3 mit **75** zu belegen, dass es sich um identische Verbindungen handelt. In Abbildung 4.3.3 ist das UV-Chromatogramme der Inkubation von 5-Methylindirubin **6** mit Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen dargestellt. Eine Überlagerung mit den unter identischen Trennbedingungen aufgenommenen UV-Chromatogramme der synthetisierten Verbindungen **74** und **75** belegt, dass die Retentionszeiten von reinem 6-Hydroxy-5-methyl-indirubin **74** (12,2 min, Abb. 4.3.3, rot) und 6,7'-Dihydroxy-5-methyl-indirubin **75** (11,6 min, Abb. 4.3.3, grün) identisch mit den Retentionszeiten der UV-Peaks M2 und M3 der Inkubation mit Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen (blau) sind.

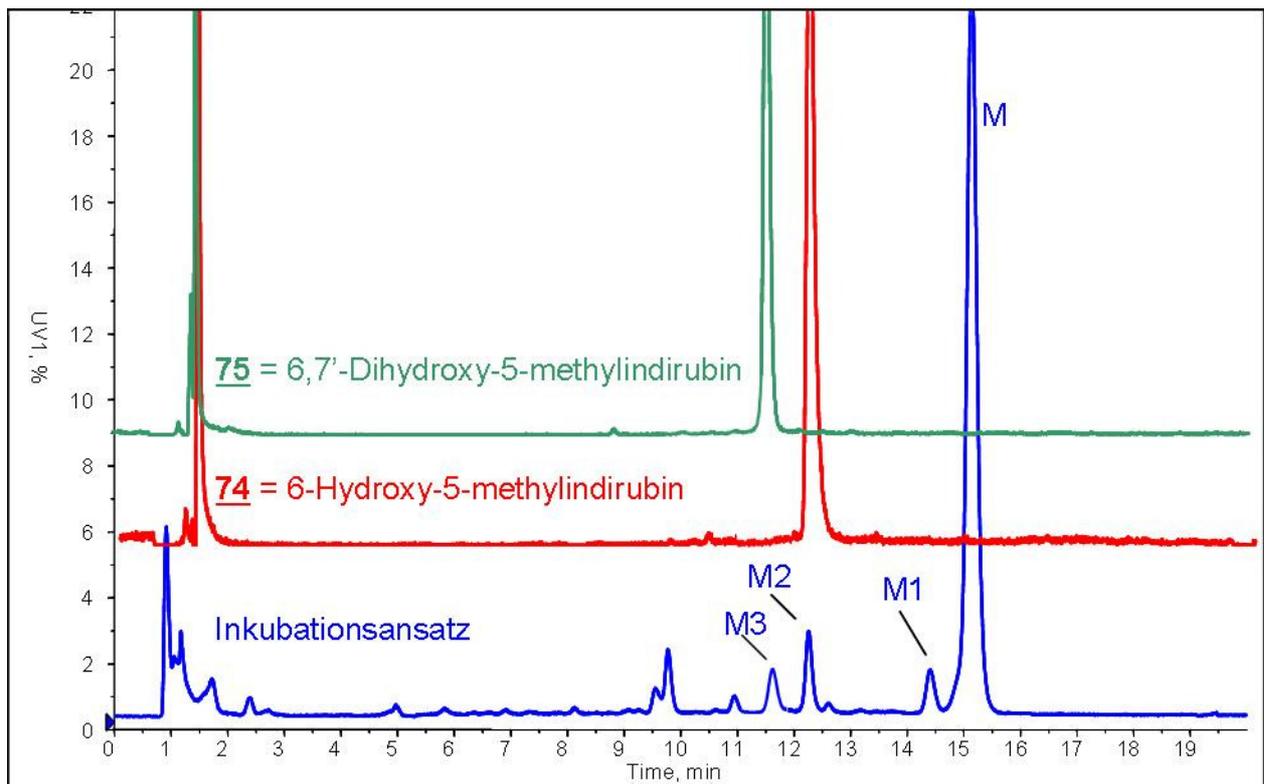


Abbildung 4.3.3: UV-Chromatogramm eines Inkubationsansatzes 5-Methylindirubin + Aroclor-induzierte Rattenlebermikrosomen, überlagert mit UV-Chromatogramm synthetisierte 6-Hydroxy-5-methylindirubin **74** und 6,7'-Dihydroxy-5-methylindirubin **75**

4.4 Biologische Untersuchungen

Die hergestellten Indirubin-Derivate sollen auf an den Zelllinien LXFL529L (Lungenkarzinomzelllinie) und C6 (Rattenglioblastomzelllinie) auf Cytotoxizität getestet werden um Aufschluss zu erhalten, ob die oxidative Umsetzung von 5-Methylindirubin **6** zu den beiden Metaboliten **74** und **75**, eine Veränderung des biologischen Wirkpotentials von **6** zur Folge hat. Hierzu wurde der SRB-Assay verwendet.

4.4.1 Sulforhodamin B (SRB)-Assay

Der Sulforhodamin B (SRB) -Assay ist eine photometrische Methode zur Ermittlung von wachstumshemmenden und cytotoxischen Effekten von Testsubstanzen auf Zelllinien. Der von Skehan et al. 1990 entwickelte Test beruht auf der Färbung des Lebendproteins von Zellen mit dem Xanthen-Farbstoff Sulforhodamin B, der unter sauren Bedingungen an die basischen Gruppen der Zellproteine bindet. Hierzu werden Zellen unter Standardbedingungen in testsubstanzhaltigem Medium kultiviert und nach einer vorgegebenen Inkubationszeit

abgestoppt. Die verbleibenden, lebenden Zellen werden mit Trichloressigsäure am Boden der Mikrotiterplatten fixiert und mit SRB eingefärbt. Nach Trocknung wird der Farbstoff im basischen Milieu mit Tris-Puffer extrahiert und bei 570 nm photometrisch vermessen. Die Extinktion der Extraktionslösung korreliert mit der Zellzahl und ist somit dem Zellwachstum proportional. [Skehan et al., 1990; Rubinstein et al., 1990; Keepers et al., 1991]

Die Cytotoxizitäts-Test wurden an der humanen Lungenkarzinomzelllinie LXFL529L und der Rattenglioblastomzelllinie C6 durchgeführt.

Die LXFL529L-Zelllinie stammt von einem grosszelligen Lungenkarzinom einer 34-jährigen Patientin das als Tumor auf immundefiziente Nacktmäuse transplantiert wurde. LXFL529L wird in unserem Arbeitskreis, wegen ihrer Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika, häufig für die Einschätzung neuer Substanzen verwendet.

Die Rattenglioblastomzelllinie C6 wurde 1968 von Benda et al. etabliert. Die Original-Zelllinie stammt aus Hirntumoren, welche durch intravenöse Applikation von *N*-Nitrosomethylharnstoff in Wistar Furth Ratten (DSMZ, Beschreibung ACC108) künstlich erzeugt wurden [Benda et al., 1968; Lee und Hait, 1985].

Die Ergebnisse der Cytotoxizitätstests sind in Tabelle 4.4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.4.1: IC₅₀-Werte der Wachstumshemmung von **6**, **74** und **75** in LXFL529L und C6-Glioblastomzellen

Substanz	IC ₅₀ [µM] LXFL529L	IC ₅₀ [µM] C6
5-Methylindirubin 6	6,8 ± 1,1	4,3 ± 0,5
M2 = 6-Hydroxy-5-methylindirubin 74	24*	5,0 ± 0,7
M3 = 6,7'-Dihydroxy-5-methylindirubin 75	28 ± 1,24	n.b.

n.b. = nicht bestimmt * = Plateau

Aus den Cytotoxizitätstests geht hervor, dass 6-Hydroxy-5-methylindirubin **74** und 6,7'-Dihydroxy-5-methylindirubin **75** einen deutlich höheren IC₅₀-Wert an der Lungenkarzinomzelllinie LXFL529L zeigen als die Ausgangsverbindung 5-Methylindirubin **6**. Für 6-Hydroxy-5-methylindirubin **74** konnte der IC₅₀-Wert nicht ermittelt werden, da bei einer Konzentration von 24 µM (T/C = 53%) ein Hemmplateau zu beobachten war. 6,7'-Dihydroxy-5-methylindirubin **75** zeigt an der Tumorzelllinie LXFL529L einen IC₅₀-Wert von IC₅₀ = 28 µM, was eine vierfach geringere Hemmwirkung als diejenige von 5-Methylindirubin **6** ist.

An der ZNS-Tumorzelllinie C6 weicht die Hemmwirkung zwischen 5-Methylindirubin **6** und 6-Hydroxy-5-methylindirubin **74** nicht so stark ab, was auf eine unterschiedliche

Verfügbarkeit (d.h. Aufnahme und Metabolismus) der entsprechenden Substanz oder eine andere Enzymausstattung der Zelllinie zurückzuführen ist.

Die drastische Abschwächung der Zellwachstumshemmung an der LXFL529L Zelllinie zeigt, dass die durch den Metabolismus generierten Verbindungen 6-Hydroxy-5-methylindirubin **74** und 6,7'-Dihydroxy-5-methylindirubin **75** nicht zu einer Aktivierung der Ausgangsverbindung in diesem Testsystem geführt hat.

Die Einführung der Hydroxy-Gruppe in Position 6 durch die metabolische Umwandlung führt also offenbar zu einer Abschwächung der Bindungsaffinität zum Enzym. Aus der Struktur der CDK2 geht hervor, dass Substituenten in Position 6 sowohl mit dem Phenylring von Phe-80 als auch mit der Seitenkette von Lys-33 wechselwirken können. Da die NH₂-Gruppe der Aminosäure Lys-33 unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegt, dürfte sie nur wenig Einfluss auf die Bindungsaffinität haben. Die Hydroxygruppe in der 6-Position kann jedoch mit Phe-80 nicht interagieren und trägt dazu bei, dass 6-Hydroxy-5-methylindirubin **74** nicht mehr so gut in die ATP-Bindungstasche der CDK2 gebunden werden kann wie die Ausgangsverbindung 5-Methylindirubin.

Die Röntgenstrukturen der CDK2 [Hössel et al., 1999b; Meijer et al., 2003; Polychronopoulos et al., 2004] zeigen weiterhin, dass ein hydrophober Bereich des Enzyms, bestehend aus Phe-82, Ile-10 und Alkylrest von Lys-89, wichtig zur Bindung von Indirubinderivaten in der Tasche ist. Eine Hydroxy-Gruppe in Position 7' ist somit klar kontraproduktiv zur bestehenden benachbarten Bindung zwischen N1'H des Indirubins zum Sauerstoff des Leu-83 der Bindungstasche, was zu einer weiteren Schwächung der Bindung zwischen Inhibitor und Enzym führt. Daraus resultiert eine verminderte Hemmung der CDK und somit auch verringerte Inhibierung des Zellwachstums.

5 Zusammenfassung

Die Substanzklasse der Indirubine stellen u.a. potente Hemmstoffe der Cyclin-abhängigen Kinasen dar, die eine Schlüsselfunktion in der Regulation des Zellzyklus besitzen. *In Vitro* zeigen sie eine Wachstumshemmung am isolierten CDK-Enzym und in verschiedenen Tumorzelllinien. In einem ersten *in vivo*-Versuch an athymen Nacktmäusen, mit subkutan implantiertem Tumorxenograft des Lungenkarzinoms LXFL529, bewirkte 5-Methylindirubin **6** einen Stillstand des Tumorwachstums.

Als Konsequenz zum *in vivo* Versuch wurde in dieser Arbeit der *in vitro* Metabolismus von 5-Methylindirubin **6** durch Inkubation mit verschiedenen tierischen Lebermikrosomen untersucht. Anschließende Identifizierung, Synthese und biologische Tests der Metaboliten sollen Aufschluss über ihr Wirkpotential geben.

Hierzu wurde eine HPLC-MS-Methode entwickelt, mit der es gelang entstandene Metaboliten zu trennen und gleichzeitig strukturelle bzw. Massen-Veränderungen der Ausgangsverbindung zu erhalten.

Es konnte gezeigt werden, dass 5-Methylindirubin **6** durch Inkubation mit Rinderlebermikrosomen zu fünf Metaboliten umgesetzt wurde, von denen vier identisch mit den Metaboliten aus den Inkubationen mit Schweinelebermikrosomen- und Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen sind. Aus den aufgenommen Massenspektren wurden zwei generierte Metaboliten als mögliche mono-hydroxylierte Strukturisomere der Ausgangsverbindung und ein Metabolit als mögliche Di-Hydroxy-Verbindung von 5-Methylindirubin **6** identifiziert.

Des Weiteren wurden 5-Bromindirubin **39**, 5-Methoxyindirubin **40** und Indirubin-3'-(2-hydroxyethyl)oximether **10** als nicht-glycosidische Indirubin-Derivate und die glycosidischen Verbindungen Indirubin-3'-(2- β -D-glucopyranosylethyl)oximether **15**, sowie die zu **15** entsprechenden 5-Iod und 5-Methyl-Verbindung (**41** und **16**) in Inkubationen mit Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen untersucht. Für sämtliche Verbindungen konnte die Bildung mehrerer Metaboliten nachgewiesen werden, wobei die zugehörigen MS-Daten, wie bei 5-Methylindirubin **6**, Hinweise auf eine Mono- bzw. Di-Hydroxylierung des Grundgerüsts der Ausgangsverbindung lieferten. Zusätzlich konnte aus den Daten der Inkubation mit Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen einen Hinweis auf die Umsatzgeschwindigkeit der getesteten Indirubine erhalten werden.

Es ergab sich folgende Reihenfolge der Umsatzgeschwindigkeit:

5-Methylindirubin **6** > 5-Methoxyindirubin **40** >> 5-Bromindirubin **39**
> 5-Iodindirubin-3'-(2- β -D-glucopyranosylethyl)oximether **41**
> Indirubin-3'-(2- β -D-glucopyranosylethyl)oximether **15**
> 5-Methylindirubin-3'-(2- β -D-glucopyranosylethyl)oximether **16**.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurde durch spezielle dünnschichtchromatographische Trennung die Inkubation von 5-Methylindirubin **6** und Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen aufgearbeitet. Die so isolierten Metaboliten M2 und M3 wurden mittels $^1\text{H-NMR}$ als 6-Hydroxy-5-methylindirubin **74** = **M2** und 6,7'-Dihydroxy-5-methylindirubin **75** = **M3** identifiziert. Um eine Aussage über das biologische Wirkpotential der beiden Metaboliten zu erhalten, wurden diese synthetisiert und anschließend einem ersten biologischen Tests unterworfen.

Zur Darstellung von **M2** wurde käufliches Indoxyl-3-acetat mit 6-Hydroxy-5-methylisatin nach einer modifizierten Methode von Russell und Kaupp umgesetzt. Das benötigte Isatin wurde aus einem geeigneten acylierten Anilin mittels regiospezifischer Metallierung (DOM-Reaktion) und anschließender Umsetzung mit Diethyloxalat selbst hergestellt.

Für die Synthese des zweiten Metaboliten M3 wurde ein Syntheseweg erstellt indem aus einer geeigneten *N*-Phenyl-glycin-*o*-carbonsäure **103** ein Diacetylintoxyl **104** erzeugt wurde, das selektiv in ein *N*-Acetylintoxyl **106** überführt wurde. Anschließend wurde durch saure Kondensation mit 6-Hydroxy-5-methyl-isatin **76** das gewünschte 6,7'-Dihydroxy-5-methylindirubin **75** erzeugt.

Die beiden so erhaltenen Metaboliten **M2=74** und **M3=75** wurden schlussendlich auf ihre Hemmwirkung im SRB-Test an den beiden Zelllinien LXFL529L (humaner grosszelliger Lungentumor) und C6 (Rattenglioblastom) getestet. Es zeigte sich, dass die erzeugten Metaboliten das Wachstum der Tumorzelllinie LXFL529L deutlich weniger hemmt als die Ausgangsverbindung 5-Methylindirubin **6**. Offenbar stellen die von 5-Methylindirubin **6** durch Mikrosomeninkubation generierten Metaboliten M2 und M3 in den getesteten Tumorzelllinien keine aktivere Wirkform dar.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeine Arbeitstechnik und Chemikalien

Ausgangsverbindungen

Für alle Umsetzungen wurden handelsübliche Chemikalien mit entsprechender Reinheit eingesetzt. Sie wurden von den Firmen Fluka, Aldrich, Merck, Lancaster und Acros bezogen. Die Lösungsmittel hatten p.a. Qualität und wurden nach gängigen Literaturvorschriften (Perrin und Armarego, 1988) absolutiert, frisch destilliert und unter Argongas aufbewahrt.

Synthesen

Alle Umsetzungen wurden, soweit erforderlich, unter Argon-Schutzgasatmosphäre (Argon 4.8 der Firma Messer-Griesheim, Reinheit > 99,995 %, welches zusätzlich über Phosphorpentoxid getrocknet wurde) unter Anwendung der Schlenk-Technik durchgeführt. Die verwendeten Glasgeräte wurden vor Gebrauch ausgeheizt, zweifach evakuiert und mit Argongas geflutet.

6.2 Geräte und Methoden

LC/MS/MS-Einheit

<i>HPLC:</i>	Perkin Elmer PE Series 200 Micro Pump
<i>HPLC-Trennsäule:</i>	Purospher RP-18e (5 μ m), LiChroCART 125-4
<i>Autosampler:</i>	Perkin Elmer PE Series 200 Autosampler
<i>UV-Detektor:</i>	Perkin Elmer PE 785 A UV/VIS-Detektor
<i>Massenspektrometer:</i>	PE SCIEX API 2000 LC/MS/MS Mit Turboionen-Spray Interface

Vakuumpumpe:	Drehschieber-Vakuumpumpe (Fa. Vacuubrand)
Rotationsverdampfer:	Rotivapor R110 und Vakuumcontroller B161 (beides Fa. Büchi)
Ultraschallbad:	Sonorex RK 102 H (Fa. Bandelin)
Waage:	Satorius laboratory; Mettler AE 163
Schüttelwasserbad:	Kottermann
Zentrifuge:	Megafuge 1.0 R (Heraeus Instruments)
Ultrazentrifuge:	Centricon T-2055 (Kontron)
Thermomixer:	Thermomixer 5436 (Eppendorf)

Photometer:	UV/VIS-Photometer Uvikon ® 810 Spektrophotometer (Kontron Instruments)
DC:	DC-Alufolien, Alugram Sil G/UV254 (Fa. Macherey & Nagel) Kieselgel 60 F254 (Merck) RP-18 F254S (Merck)
Säulenchromatographie:	Kieselgel Typ 60 (0,063-0,200 mm) (Fa. Macherey & Nagel)

Zur spektroskopischen und analytischen Untersuchung der synthetisierten Verbindungen wurde folgende Analysenmethoden eingesetzt:

Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden am LC/MS/MS-Gerät durchgeführt.

NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden an dem Bruker AMX 400 der Firma Bruker gemessen. Die Substanzen wurden als Lösungen in deuterierten Lösungsmitteln in 5 mm-Röhrchen vermessen. Die chemischen Verschiebungen sind entsprechend der δ -Skala angegeben; zur Charakterisierung der Spinmultiplizitäten werden die allgemein üblichen Abkürzungen verwendet:

s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppeldublett, t = Triplett, pd = Pseudodublett, pt = Pseudotriplett, q = Quartett, quin = Quintett, sext = Sextett, sept = Septett, m = Multipllett.

Die Angabe der Kopplungskonstanten erfolgt in Hertz (Hz).

Für die unterschiedlichen Kerne gelten folgende Messfrequenzen und Standards:

¹H-NMR:

400,13 MHz (Bruker AMX 400); als interner Standard wurden die Signale der in den deuterierten Lösungsmitteln vorhandenen, nicht vollständig deuterierten Moleküle verwendet.

¹³C-NMR:

100,61 MHz (Bruker AMX 400) bzw. 50,32 MHz (Bruker AC 200); als interner Standard wurden die Signale der deuterierten Lösungsmitteln verwendet.

6.3 Mikrosomen-Präparation

6.3.1 Verwendete Chemikalien

BCA Protein Assay Reagent (Pierce)

Dimethylsulfoxid (DMSO-d₆) (Merck)

NADPH-generierendes System:

β-Nicotinamidadeninucleotidphosphat (β-NADP) (Sigma)

D-Glucose-6-Phosphat Dinatriumsalz Dihydrat (Fluka)

D-Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (Sigma)

Alle anderen Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich, Fluka und Merck bezogen und hatten p.a.-Qualität.

6.3.2 Lösungen

Proteinbestimmung

Lösung A:	Bicinchoninsäure mit Na ₂ CO ₃ , NaHCO ₃ , Natriumtartrat in 0,2 N NaOH
Lösung B:	4 %ige Kupfersulfatlösung
BCA-Reagenz:	Lösung A und B im Verhältnis 50:1
Albumin-Standard:	Proteingehalt 2 mg/ml

Inkubationsansatz

E224 (5-Methylindirubin), 2 mM:	5,8 mg/10ml
E246 (Indirubin-3'-hydroxyethyloximether), 2 mM:	6,4 mg/ml
E211 (Indirubin), 2 mM:	5,3 mg/ml
Magnesiumchlorid-6-hydrat, 0,3 M	6,1 mg/100ml
Kaliumphosphatpuffer:	0,5 M K ₂ HPO ₄ -Lösung (7,1 g/100ml) mit 0,5 M KH ₂ PO ₄ - Lösung (6,9 g/100ml) auf pH 7,4 titrieren
NADP-Lösung, 50 mM:	38,27mg/ml
Glucose-6-Phosphat, 500 mM:	170 mg/ml

Mikrosomenpräparation

MIC-I-Puffer (pH 7,5)

Saccharose, 0,25 M:	85,58 g/l
EDTA, 5,5 mM:	2,05 g/l
Tris, 0,2 M:	2,42 g/l

MIC-II-Puffer (pH 7,4)

Kaliumchlorid, 0,15 M:	893mg/100ml
Tris, 0,05 M:	605 mg/100ml

Die pH-Werte beider Puffer wird mittels HCl eingestellt.

6.3.3 Gewinnung der tierischen Lebermikrosomen

Folgende Chemikalien werden benötigt:

<i>MIC-I-Puffer pH 7,5:</i>	0,25 M Saccharose
	5,5 mM EDTA
	0,2 M Tris
<i>MIC-II-Puffer pH 7,4:</i>	0,15 M Kaliumchlorid
	0,05 M Tris

Die Herstellung der Mikrosomen erfolgt nach dem Prinzip einer fraktionierten Zentrifugation. Alle Arbeitsschritte erfolgen unter Eiskühlung.

- **Homogenisierung**

Lebergewebe wird mit einer Schere in kleine Teile zerschnitten und mit einer äquivalenten Menge an eisgekühltem *MIC-I*-Puffer versetzt. Diese Lösung wird in je 20 ml Portionen im Zellhomogenisator fünfmal gepottert und das Homogenat in einem gekühlten Becherglas gesammelt und anschließend zentrifugiert.

- **Fraktionierte Zentrifugation**

Die einzelnen Zentrifugationsschritte werden bei 4°C durchgeführt.

1. Zentrifugation: ⇒ **Erhalt der S-9 Fraktion durch Abtrennung von Geweberesten, Zellkern und Mitochondrien**

Das gesammelte Homogenat wird in acht große Zentrifugengläser verteilt und mittels des folgenden Programms zentrifugiert:

Programm:	10 min bei 3500 Umdrehungen (100 g)
	10 min bei 6000 Umdrehungen (3000 g)
	10 min bei 10000 Umdrehungen (9000 g)

Der gewonnene Überstand (**S-9 Fraktion**) wird abdekantiert und in einem gekühlten Becherglas gesammelt.

2. Zentrifugation: ⇒ **Abtrennung der Mikrosomenfraktion**

Die gesammelte S-9 Fraktion wird in acht kleine Zentrifugengläser verteilt und zentrifugiert:

Programm:	60 min bei 40000 Umdrehungen (105000 g)
-----------	-----------------------------------------

Vom Überstand wird die Fettschicht vorsichtig mittels einer Pasteurpipette und Wasserstrahlvakuum abgesaugt. Das Cytosol wird abdekantiert. Das Pellet, das die Mikrosomen enthält wird mit *MIC-I*-Puffer (4°C) überschichtet und durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert und vom Glykogen abgetrennt, das als glasiger Körper im Zentrifugenglas zurückbleibt. Die Mikrosomen/*MIC-I*-Puffer-Suspension wird anschließend mit dem Handpotter homogenisiert.

3. Zentrifugation: ⇒ Reinigung der Mikrosomenfraktion

Die erhaltene Mikrosomensuspension wird unter gleichen Bedingungen wie bei der 2. Zentrifugation zentrifugiert:

Programm: 60 min bei 40000 Umdrehungen (105000 g)

Der Überstand wird verworfen und das Pellet in *MIC-II*-Puffer resuspendiert (1/3 Puffer bezogen auf die Lebereinwaage). Nach erneutem Homogenisieren mit dem Handpotter werden die Mikrosomen in Epicaps aliquotiert und bei -74°C im Biofreezer aufbewahrt.

6.3.4 Aroclor-induzierte Rattenlebermikrosomen

Die Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen wurden zum Teil von Herrn Dr. Eric Fabian, BASF AG, Ludwigshafen zur Verfügung gestellt und zum Teil aus eigener Rattenzucht in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Hans Schmitz, AK. Prof. Dr. Schrenk, induziert und präpariert.

Zur Aroclor-Induktion wird zuerst eine Lösung bestehend aus 1g Aroclor 1254 in 10 ml Sonnenblumenöl hergestellt. Die Aroclor-Induktion an männlichen Wistar-Ratten mit einem Gewicht von ca. 150 g erfolgte durch die einmalige i.p. Applikation von 500 µl / 100 g Körpergewicht dieser Lösung. Nach 5 Tage wurde die Leber entnommen und identisch zu Kapitel 6.3.3 aufgearbeitet.

6.3.5 Bestimmung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt der Lebermikrosomen wird mit Hilfe des BCA Protein Assay nach Pierce bestimmt [Baum, 1999]. Bei der stattfindenden Biuret-Reaktion reduzieren Proteine in alkalischer Lösung Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen, die mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex bilden, welches eine starke Absorption bei 562 nm zeigt (Abb. 6.1). Der Proteingehalt wird photometrisch mit Hilfe einer Eichkurve (verschiedene Verdünnungen einer Albumin-Standardlösung) ermittelt.

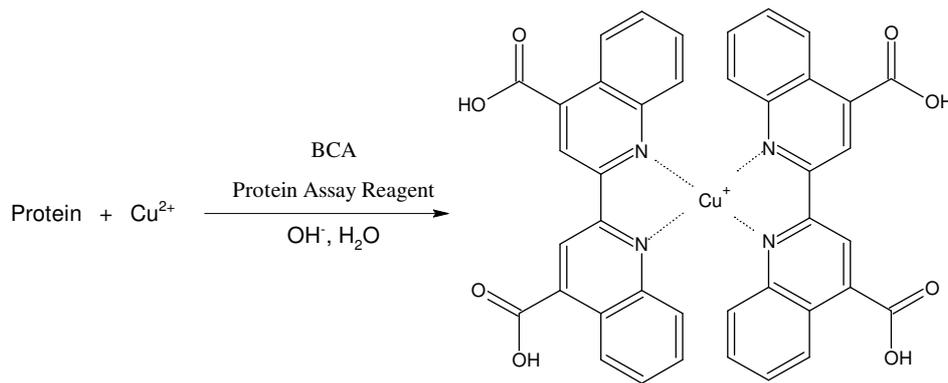


Abbildung 6.1: Proteinbestimmung mit BCA Protein Assay Reagent (Pierce)

Durchführung:

Das BCA-Reagenz wird durch Mischen der Lösungen A und B (50:1) frisch hergestellt (*siehe* 6.3.2). 9 Albumin-Standardlösungen mit verschiedenen Proteinkonzentrationen (0,05-2 mg/ml) werden hergestellt. Jeweils 50 µl der Standardlösungen, der Probe und einer Blindprobe werden mit 1 ml BCA-Reagenz gut durchgemischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden alle Lösungen bei 562 nm spektralphotometrisch vermessen. Anhand der Extinktion der Standardlösungen wird eine Eichgerade erstellt, die die Ermittlung der Proteinkonzentration der Mikrosomenprobe ermöglicht.

6.3.6 Quantitative Bestimmung der CYP450- und Cytochrom b₅-Gehalte

Nach einem von Sato und Omura [Omura und Sato, 1962 und 1964] entwickelten Verfahren erfolgte die quantitative Bestimmung der CYP450 und Cytochrom b₅-Gehalte in den verwendeten Lebermikrosomen.

- **Cytochrom b₅-Bestimmung**

Die Lebermikrosomen werden mit *MIC-II*-Puffer (*siehe* 6.3.2) auf einen Proteingehalt von 1 mg/ml verdünnt. Von den Verdünnungen werden jeweils 2,5 ml in zwei Quarzküvetten gefüllt und diese in den beiden Strahlengängen des Photometers platziert.

Zuerst wird ein Spektrum der reinen Mikrosomensuspension gefahren, um die Nulllinie (Grundlinie) zu markieren, bevor nach Reduktion des Cytochrom b₅ durch einige Körnchen NADH in einer der Küvetten das Differenzspektrum im Bereich von 390-500 nm aufgenommen werden.

- **CYP450-Bestimmung**

In der gleichen Probenlösung kann der Gehalt an CYP450 bestimmt werden, da das NADPH nicht in der Lage ist das CYP450 zu reduzieren und da Cyochrom b₅ kein Kohlenmonoxid bindet. Nach Zugabe weniger Körnchen Natriumdithionit in beide Küvetten und Einleiten von Kohlenmonoxid in eine der Küvetten kann das Differenzspektrum im Bereich 390-500 nm aufgenommen werden.

- **Berechnung des CYP450 und des Cytochrom b₅-Gehaltes**

Cytochrom b₅:

Die Konzentration wird nach folgender Formel berechnet:

$$c(\text{Cytochrom } b_5) = \frac{E \cdot 9,53}{\text{Proteinkonzentration}} \quad [\text{nmol/mg Protein}]$$

mit: $E = E_{424\text{nm}} - E_{450\text{nm}}$

CYP450::

Die Konzentration wird nach folgender Formel berechnet:

$$c(\text{CYP450}) = \frac{E \cdot 10,89}{\text{Proteinkonzentration}} \quad [\text{nmol/mg Protein}]$$

mit: $E = E_{450\text{nm}} - E_{490\text{nm}}$

6.4 Metabolismus von Indirubinen

6.4.1 Inkubation der Mikrosomen

Die Inkubation der Mikrosomen mit den verschiedenen Indirubin-Derivate wird mit einem Gesamtvolumen von 2000 µl bei 37°C in Dunkelheit und maximaler Schüttelgeschwindigkeit im Schüttelbad durchgeführt.

Die Blindprobe enthält durch 5 minütiges Kochen in Phosphatpuffer inaktivierte Mikrosomen. Ein Inkubationsansatz enthält 200 nmol der Testsubstanz, 0,1 mmol Kaliumphosphat (pH 7,4), 6 µmol Magnesiumchlorid-Puffer, 2 mg mikrosomales Protein, 2 µmol NADP⁺, 10 µmol Glucose-6-Phosphat, 1Unit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in einem Gesamtvolumen von 2 ml.

Tabelle 6.1 zeigt das Pipettierschema für die mikrosomale Umsetzung der Indirubin-Derivate.

Tabelle 6.1: Pipettierschema der mikrosomalen Inkubationsansätze

Lösungen	Volumen	Endkonzentration im Inkubationsansatz (2ml)
0,5M Kaliumphosphat-Puffer	200 μ l	50 mM
0,3M Magnesiumchlorid-Puffer	20 μ l	3 mM
mikrosomales Protein in bidest H ₂ O	2 mg Protein in 1400 μ l bzw. 1 mg Protein in 1400 μ l	2 mg bzw. 1 mg
Testsubstanz: 2mM in DMSO	100 μ l	100 μ M in 5% DMSO
Vorinkubation: 5 min bei 37°C im Schüttelwasserbad		
50mM NADP	40 μ l	1 mM
500mM Glucose-6-Phosphat	20 μ l	5 mM
250 Units / 5ml Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	20 μ l	1 Unit

Nach Zugabe des NADPH generierendem System werden die Inkubationen für eine definierte Zeit im Dunkeln im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert, durch Zugabe von 2 ml gekühltem Aceton (-20°C) abgestoppt und anschließend mittels 2 ml Ethylacetat extrahiert. Um zu vermeiden, dass Mikrosomfragmente in die organische Phase mitübergehen, wird vor jedem Abtrennen der organische Phase, eine Zentrifugation der Mischung bei 6000 rpm für 5 Minuten durchgeführt. Anschließend wird die gewonnene extrahierte Ethylacetat-Phase durch einen Stickstoffstrom eingengt. Der erhaltene Rückstand wird in Methanol aufgenommen und je 100 μ l dieser Lösung wird für die analytische Analyse per HPLC-MS/MS verwendet was 20 μ mol der Testsubstanz entspricht.

Es wurden jeweils Doppelbestimmungen mit je einer Blindprobe mit hitzeinaktivierten Mikrosomen durchgeführt.

6.4.2 Analyse der Produkte

Die Auftrennung und Analyse der methanolischen Lösung erfolgt mittels Reversed-Phase-HPLC an einer Purospher RP-18 endcapped Säule nach dem in Tabelle 6.2 angegebenen Gradientenprogramm. Er wurde zur Trennung von 5-Methylindirubin erstellt und wird gleichzeitig auch für die anderen getesteten Verbindungen verwendet. Als Fließmittel wird jedoch zur besseren Ionisierung der Verbindung für die MS, nicht Wasser sondern eine 10 mM Ammoniumacetat-Lösung eingesetzt. Die Ionisation wird so durch die Protonierung,

Kationenanlagerung, Deprotonierung, Anionenlagerung oder Reaktion von Elektrolytionen mit Molekülen in der Gasphase erreicht. Wegen seiner rückstandslosen Verdampfbarkeit wird hierfür oft Ammoniumacetat eingesetzt. (Schmelzeisen-Redeke, 1989)

Tabelle 6.2: RP-HPLC-Gradientenprogramm zur Trennung der Indirubinmetabolite Purospher RP-18e (5µm), LiChroCART 125-4

Zeit [min]	Methanol [%]	Ammoniumacetat 10 mM [%]
0	30	70
10	80	20
30	80	20
35	30	70

Die Detektion erfolgt mit Hilfe eines Online-UV-Detektors der in Reihe zur MS/MS geschaltet ist. Die UV-Detektion erfolgt bei 292 nm.

6.5 Massenspektrometer

6.5.1 Bedingungen

Das verwendete Massenspektrometer, API 2000, ist ein Tripelquadrupol-Massenspektrometer der Firma PE SCIEX das über ein Turboionenspray-Interface mit der HPLC gekoppelt ist. Sämtliche durchgeführte Messungen erfolgten im positiven Ionisationsmodus. Als Vernebelungs-, Curtain- und Kollisionsgas wurde Stickstoff verwendet der durch ein Gasgenerationssystem (Nitrogen-Generator Model 75-72, Whatman) gewonnen wurde.

Um eine Überladung des Turboionenspray-Interface zu vermeiden wurde das Eluat der HPLC (1 ml/min) in einem Verhältnis von 1:1 gesplittet, so dass eine bessere Verneblung und somit ein vereinfachter Übergang der Ionen aus der flüssigen in die Gasphase erreicht wird.

Die Kalibration des Massenspektrometers erfolgte durch Infusion (10µl/min) einer kommerziellen Mischung von Polypropylenglykol (PE, Applied Biosystems) durch eine Havard Syringe (Spritzen)-Pumpe wobei auf acht Masse/Ladungsverhältnisse im Bereich zwischen 55 und 2300 amu optimiert wurde. Die instrumentelle Kontrolle und Datenspeicherung wurde mit der Analyst 1.1 Software (PE SCIEX) durchgeführt.

Zur Detektion der Analytsubstanzen und Metabolite im Massenspektrometer können gerätespezifische und substanzspezifische Parameter am Massenspektrometer variiert werden. Sie kontrollieren die Spannungen der Linsen, Quadrupole und anderer Teile des Massenspektrometers.

Man unterscheidet drei Typen von Parametern:

- Analytabhängige Parameter
- von der Art der Ionenquelle abhängige Parameter
- Instrumentabhängige Parameter

Analytabhängige Parameter

- *Declustering Potential (DP)*

DP ist die Differenz zwischen der Orifice- und Skimmerspannung. Sie hat einen großen Effekt auf die Fragmentation der Ionen in der Orifice-Skimmer-Region. Je höher die Spannung, um so höher ist die Entclustering.

- *Focusing Potential (FP)*

Das Focusing Potential fokussiert die Ionen durch den Skimmer. Es beeinflusst ebenfalls die Entclustering und Fragmentierung der Ionen in der Orifice-Skimmer-Region. Das Focusing Potential ist die Differenz zwischen der Spannung am Fokussierungsring und der Skimmerspannung.

- *Entrance Potential (EP)*

Das Entrance Potential ist die Differenz zwischen der Spannung im Hochvakuum-Eintrittsquadrupol Q0 und der Skimmerspannung.

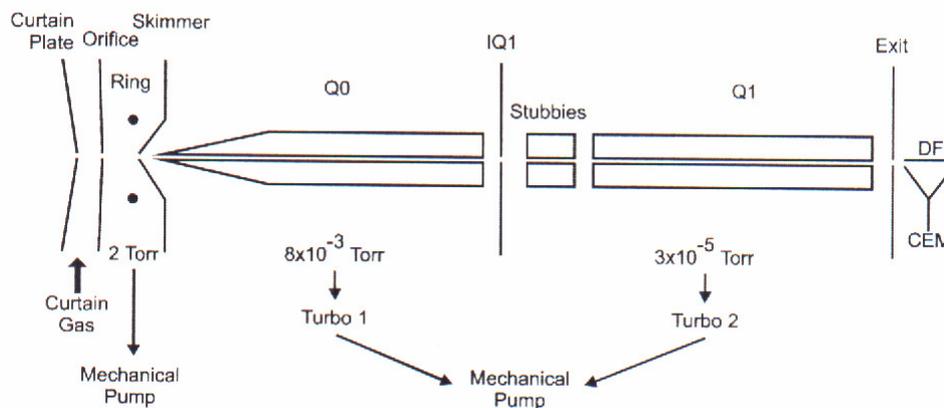


Abbildung 6.2: API Single Quadrupol (PE SCIEX Operators Manual)

- *Collision Cell Entrance Potential (CEP)*

CEP ist die Spannungsdifferenz zwischen der Entrancespannung (Q0) und der Spannung an der zweiten Interquadrupollinse (IQ2). IQ2 ist eine Fokussierungslinse im zweiten Quadrupol. Dieses Potential wird bei Q1 und MS/MS scans genutzt.

- *Collision Energy (CE)*

CE ist die Spannungsdifferenz zwischen Fokussierungsquadrupol Q1 und der Collisionszelle Q2.

Elektrosprayabhängige Parameter

- *Curtain Gas (CUR)*

Gas zwischen der Curtainplatte und der Orificeplatte. Es verhindert die Verschmutzung der Ionenoptik. Das Curtaingas ist von der Flussrate des Lösungsmittels abhängig.

- *Ionspray Voltage (IS)*

Spannung an der Nadel, die die Probe ionisiert und vernebelt. Die Ionenspray Spannung ist abhängig von der Polarität und beeinflusst die Stabilität des Sprays und die Empfindlichkeit der Detektion.

- *Temperatur (TEM)*

Temperatur des beheizten Gasstroms in einer Turboionenspray Ionenquelle.

Dieser Parameter ist von der Lösungsmittelzusammensetzung und Flussrate abhängig .

- *Collision Gas (CAD)*

Gas in der Collisionszelle Q2, die für die Fragmentierung der Molekülonen in der Tandem-Massenspektrometrie verantwortlich ist

- *Gas 1 (GS1)*

Vernebelungsgas im API 2000

- *Gas 2 (GS2)*

Hilfs- oder Turbogas im API 2000, beheizbar.

Instrumentabhängige Parameter

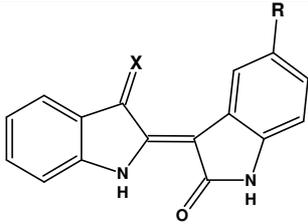
Abhängig vom jeweiligen Massenspektrometer. Die als Instrumentdaten gespeicherten Parameter beinhalten Auflösung und Detektorparameter, wie Einstellungen des Elektronenmultipliers.

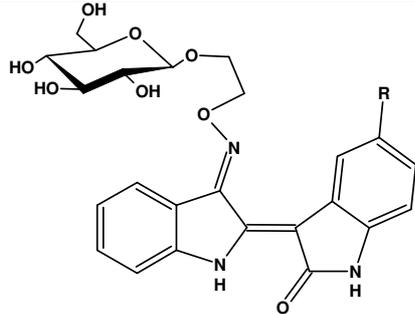
6.5.2 Optimierung

Die Optimierung der im vorherigen Kapitel erwähnten Parameter auf die Analytsubstanz erfolgte indem zuerst über eine separate Spritze am MS (sog. Havard Syringe Pump) eine Lösung des Analyten (hier: Indirubin in DMSO) mit einem Fluß von 10 µl/min in das Gerät geführt wurde und ein Massenspektrum über eine bestimmte Scanzeit aufgenommen wurde. Sobald der Totalionenstrom stabil war, kann im Menü „Quantitation Optimization“ eine MS oder MS/MS-Optimierung eines bestimmten Moleküls durchgeführt werden. Es handelt sich hierbei um ein automatisches Tunen aller internen Spannungen für eine bestimmte Masse. Die so erhaltenen Daten dienen dann weiter als Anhaltspunkt für die MS-Einstellungen zur Optimierung der Parameter für normalen HPLC-Betrieb. Hierzu muss eine Fließinjektionsanalyse (FIA) durchgeführt werden.

Es handelt es sich hierbei um einen HPLC-MS-Lauf ohne Säule (no-column in-line) bei Flussraten wie sie im späteren Experiment verwendet werden. Bei Verwendung eines Fließmittelgradienten wird hierzu die mittlere Fließmittelzusammensetzung gewählt. Bei wiederholter Injektion der Probelösung durch den Autosampler werden die verschiedenen Parameter automatisch vom System variiert, um die optimal Einstellung herauszufinden, die von der Fließmittelzusammensetzung und der Flussrate stark abhängig ist. In Tabelle 6.3 sind die optimierten Einstellungen der Parameter für die einzelnen Verbindungen dargestellt.

Tabelle 6.3: Optimierte Einstellungen mittels FIA

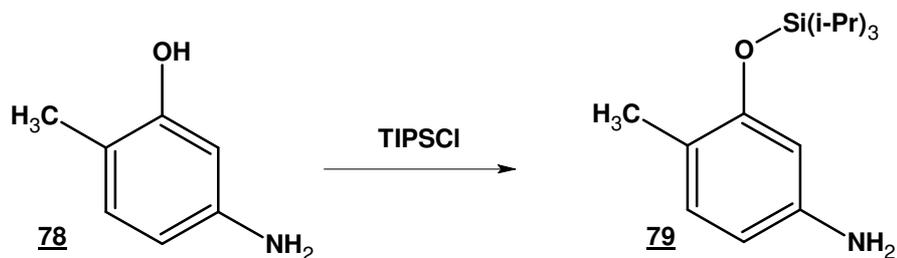
				
	6 R = Me, X = O	39 R = Br, X = O	40 R = OMe, X = O	10 R = H, X = N-O(CH ₂) ₂ OH
CUR	25	20	22	20
IS	5000	4950	4956	4950
GS1	18	20	22	25
GS2	45	30	35	30
TEM	550	500	550	550
DP	86	70	151	146
FP	360	360	360	390
EP	-9,5	-11	-12	-8,0

			
	15 R = H	16 R = Me	41 R = I
CUR	25	25	20
IS	4966	4850	4974
GS1	25	23	23
GS2	30	30	31
TEM	500	550	500
DP	147	186	151
FP	373	340	362
EP	-5	-5	-5

6.6 Synthesevorschriften und analytische Daten

6.6.1 Synthese der Ausgangsverbindungen zur Herstellung von 6-Hydroxy-5-methyl-indirubin (**75**)

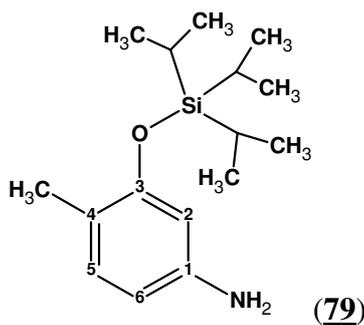
6.6.1.1 Herstellung von 4-Methyl-3-(triisopropylsilyloxy)-anilin (**79**)



Zu einer Lösung bestehend aus 5-Amino-2-methyl-phenol (**78**) (12 g, 97 mmol) und Imidazol (16,3 g, 240 mmol) in 60 ml Pyridin werden 25 ml (117 mmol) Triisopropylsilylchlorid zugetropft und 3 Tage bei RT gerührt. Nach Zugabe von Wasser wird 3 mal mit 50 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die CH₂Cl₂-Phasen werden vereinigt, mit einer gesättigten wässrigen NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel abgezogen.

Ausbeute: 24,3 g (87 mmol; 90 %); 4-Methyl-3-(triisopropylsilyloxy)-anilin (**79**), hellgelbe Flüssigkeit (MW: 279,49 g/mol)

R_f: 0,48 [Hexan/Ethylacetat 4:1]



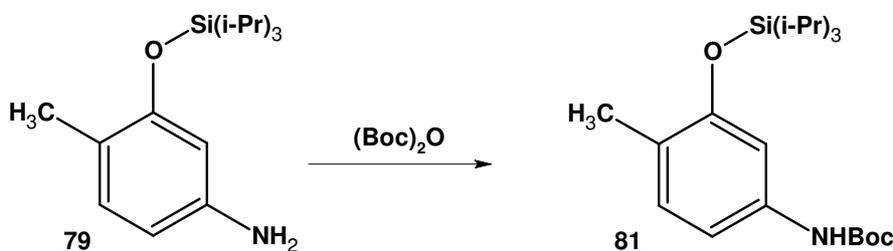
¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃):

δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
6,88	d, 1 H	³ J _{H,H} = 7,9 Hz	C5H
6,21	dd, 1H	³ J _{H,H} = 7,8 Hz, ⁴ J _{H,H} = 2,3 Hz	C6H
6,18	d, 1 H	⁴ J _{H,H} = 2,3 Hz	C2H
3,46	bs, 2 H		NH ₂
2,13	s, 3 H		C4-CH ₃
1,33-1,24	m, 3 H		3 Si-(CH)-(CH ₃) ₂
1,12	d, 18 H	³ J _{H,H} = 7,2 Hz	3 Si-(CH)-(CH ₃) ₂

¹³C-NMR-Spektrum (CDCl₃):

δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
154,8	s		C3
145,1	s		C1
131,1	d	¹ J _{C,H} = 155 Hz	C5
118,7	s		C4
107,8	d	¹ J _{C,H} = 157 Hz	C6
105,9	d	¹ J _{C,H} = 153 Hz	C2
18,0	q	¹ J _{C,H} = 122 Hz	Si-(CH)-(CH ₃) ₂
16,2	q	¹ J _{C,H} = 126 Hz	C4-CH ₃
13,0	d	¹ J _{C,H} = 110 Hz	Si-(CH)-(CH ₃) ₂

6.6.1.2 Herstellung von tert-Butyl-(4-methyl-3-(triisopropylsilyloxy)-phenyl)-carbammat (81**)**



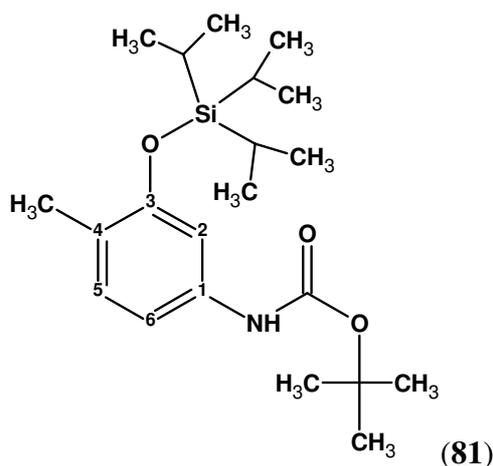
Das Rohprodukt **79** (24,3 g; 87 mmol) wird in 200 ml THF gelöst und mit (33 ml, 146 mmol) Di-tert-butylcarbonat (Boc)₂O versetzt. Nach 20 Stunden rühren bei Raumtemperatur wird das Lösungsmittel abgezogen, der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit CH₂Cl₂

extrahiert. Die CH_2Cl_2 -Phase wird mit einer gesättigten wässrigen NaCl -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel abgezogen.

Aufreinigung: Umkristallisation aus Hexan

R_f: 0,91 [Hexan/Ethylacetat 1:1]

Ausbeute: 30,1 g (79,3 mmol; 91 %); *tert*-Butyl-(4-methyl-3-(triisopropylsilyloxy)-phenyl)-carbamat **81**, farblose Nadeln



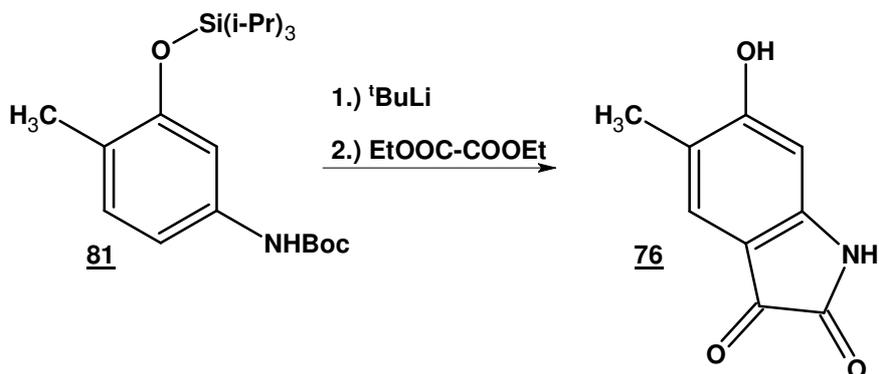
¹H-NMR-Spektrum (CDCl_3):

δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
7,00	d, 1 H	$^3J_{\text{H,H}} = 8,2 \text{ Hz}$	C5H
6,91	d, 1H	$^3J_{\text{H,H}} = 7,9 \text{ Hz}$,	C6H
6,73	s, 1 H		C2H
6,31	s, 1 H		NH
2,16	s, 3 H		C4CH ₃
1,50	s, 9 H		COO(C(CH ₃) ₃)
1,33-1,25	m, 3 H		3 Si-(CH)-(CH ₃) ₂
1,10	d, 18 H	$^3J_{\text{H,H}} = 7,3 \text{ Hz}$	3 Si-(CH)-(CH ₃) ₂

¹³C-NMR-Spektrum (CDCl_3):

δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
154,4	s		-COO
152,5	s		C3
136,9	s		C1
130,8	d	$^1J_{\text{C,H}} = 162 \text{ Hz}$	C5
123,2	s		C4
110,8	d	$^1J_{\text{C,H}} = 158 \text{ Hz}$	C6
108,7	d	$^1J_{\text{C,H}} = 158 \text{ Hz}$	C2
80,1	s		-C(CH ₃) ₃
28,3	q	$^1J_{\text{C,H}} = 127 \text{ Hz}$	-C(CH ₃) ₃
18,0	q	$^1J_{\text{C,H}} = 126 \text{ Hz}$	Si-(CH)-(CH ₃) ₂
16,4	q	$^1J_{\text{C,H}} = 127 \text{ Hz}$	C4-CH ₃
13,0	d	$^1J_{\text{C,H}} = 112 \text{ Hz}$	Si-(CH)-(CH ₃) ₂

6.6.1.3 Herstellung von 6-Hydroxy-5-methyl-isatin (76)



Unter Argon wird zu einer Lösung bestehend aus *tert*-Butyl-(4-methoxy-)-phenyl-carbamat **81** (12,3g, 32 mmol) in 65 ml abs. Ether bei -20°C langsam 55ml (81 mmol) einer 1,5 M *tert*-Butyllithium-Lösung in Pentan zugetropft. Die Lösung wird 2 Stunden lang bei -20°C gerührt. Anschließend wird eine Lösung aus 5,5 ml frisch destilliertem Diethyloxalat (40,4 mmol) in 35 ml Ether innerhalb von 5 Minuten zugetropft. Nach 2 Stunden wird das Kältebad entfernt. Das Reaktionsgemisch wird dann mit 400 ml 1N HCl gerührt und mit Ethylacetat extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand mit 320 ml einer 1:1 Mischung bestehend aus Ethanol und 6N HCl 1 Stunde zum Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen, Extraktion mit Ethylacetat und anschließendem Einengen des Lösungsmittels erhält man einen braunen öligen Rückstand.

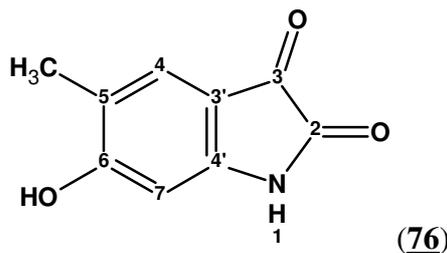
Aufreinigung: Der erhaltene braune Rückstand wird chromatographisch (Flash-Säulenchromatographie) aufgereinigt.

Säule: Durchmesser 4,3 cm, Länge 46 cm, Kieselgel, Hexan/Aceton 1:1

R_f: 0,46 [Hexan/Aceton 1:1]

Ausbeute: 1,1 g (6,2 mmol; 19 %); 6-Hydroxy-5-methyl-isatin (**76**), rot-violettes Pulver. (MW: 177,16 g/mol)

MS-Daten: $M/z = 178,2$ amu $[M+H]^{\bullet+}$
 $M/z = 160,2$ amu $[M+H-H_2O]^{\bullet+}$

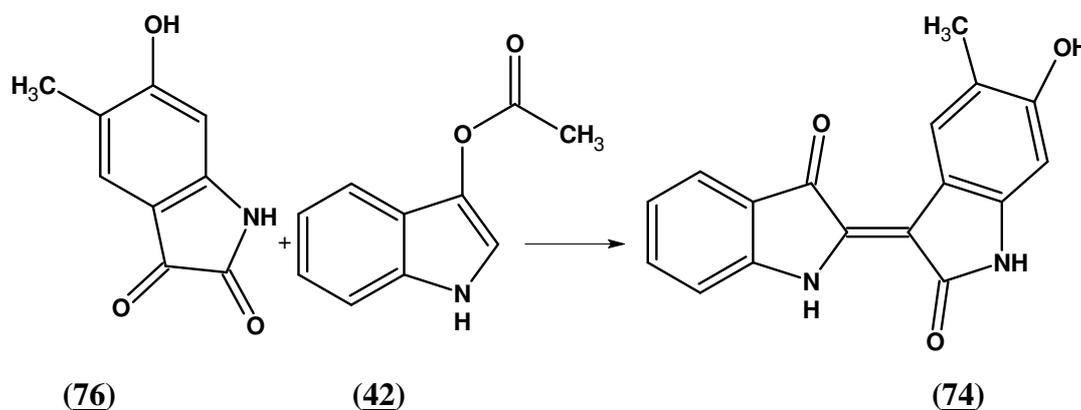


¹H-NMR-Spektrum (DMSO-d₆):

δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
11,20	bs, 1 H		-OH
10,67	s, 1H		-NH
7,26	s, 1 H		C4H
6,34	s, 1 H		C7H
2,01	s, 3 H		C5CH ₃

¹³C-NMR-Spektrum (DMSO-d₆):

δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
181,2	s		C3
165,7	s		C2
161,2	s		C6
152,4	s		C7a
127,8	d	¹ J _{C,H} = 161 Hz	C4
119,3	s		C5
109,6	s		C3a
98,7	d	¹ J _{C,H} = 163 Hz	C7
15,4	q	¹ J _{C,H} = 128 Hz	C5-CH ₃

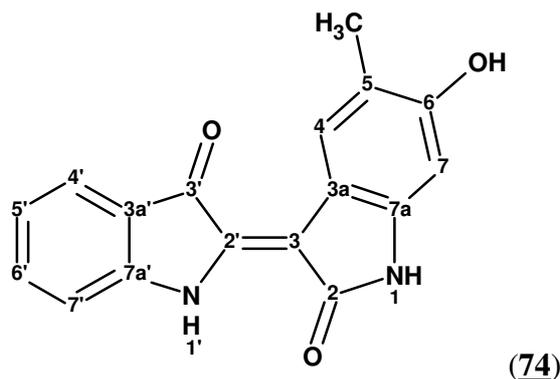
6.6.2 Herstellung von 6-Hydroxy-5-methyl-indirubin (74)

Unter Argon löst man 144 mg (0,81 mmol) 6-Hydroxy-5-methyl-isatin **76** in 25 ml Methanol und gibt unter Rühren 121 mg (0,69 mmol) Indoxyl-3-acetat **42** und 160 mg (1,5 mmol) Natriumcarbonat hinzu. Die Reaktionsmischung wird 24 Stunden bei RT gerührt, danach mit Ethylacetat extrahiert und mit Wasser sowie einer gesättigten, wässrigen NaCl-Lösung gewaschen.

Ausbeute: 35 mg (0,12 mmol; 16 %); 6-Hydroxy-5-methyl-indirubin (**74**),
blaues Pulver (MW: 292,29 g/mol).

R_f: 0,6 [Hexan/Aceton 1:1]

MS-Daten: M/z = 293,1 amu [M+H]^{•+}
M/z = 277,8 amu [M+H-CH₃]^{•+}
M/z = 249,0 amu [M+H-HNHCO]^{•+}



¹H-NMR-Spektrum (DMSO-d₆):

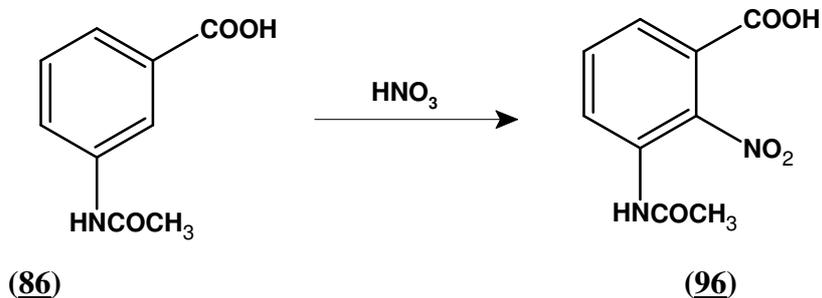
δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
10,69	s, 1 H		-N1H od. -N1'H
10,62	s, 1 H		-N1H od. -N1'H
9,97	s, 1 H		-OH
8,58	s, 1 H		C4H
7,60	d, 1 H	³ J _{H,H} = 7,7 Hz	C4'H
7,52	t, 1 H	³ J _{H,H} = 7,7 Hz	C6'H
7,37	d, 1 H	³ J _{H,H} = 8,2 Hz	C7'H
6,96	t, 1 H	³ J _{H,H} = 7,4 Hz,	C5'H
6,42	s, 1 H		C7H
2,11	s, 1 H		-CH ₃

¹³C-NMR-Spektrum (DMSO-d₆):

δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
188,1	s		C3'
171,9	s		C2
158,0	s		C6
152,4	s		C2'
141,7	s		C7a'
136,7	d	¹ J _{C,H} = 161 Hz	C6'
135,4	s		C7a
127,9	d	¹ J _{C,H} = 163 Hz	C4
124,1	d	¹ J _{C,H} = 163 Hz	C4'
120,6	d	¹ J _{C,H} = 163 Hz	C5'
119,4	s		C3a'
116,5	s		C5
113,4	d	¹ J _{C,H} = 168 Hz	C7'
113,1	s		C3a
108,9	s		C3
97,5	d	¹ J _{C,H} = 160 Hz	C7
16,3	q	¹ J _{C,H} = 127 Hz	-CH ₃

6.6.3 Synthese der Ausgangsverbindungen zur Herstellung von 6,7'-Dihydroxy-5-methylindirubin (75)

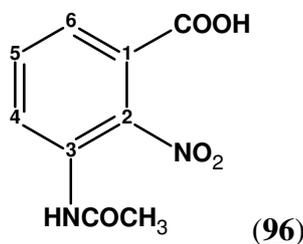
6.6.3.1 Herstellung von 3-Acetamino-2-nitro-benzoesäure (96)



Zu 46 ml rauchender HNO_3 gibt man innerhalb von einer Stunde 25 g (139,5 mmol) 3-Acetaminobenzoesäure **86** in kleinen Portionen, wobei die Temperatur zwischen 0°C und 5°C gehalten wird (Eis/Kochsalz). Nach 2 h Rühren bei Eiskühlung wird das Reaktionsgemisch auf 200 g Eis gegeben. Nach 12 h wird das Rohprodukt (2 Hauptbestandteile) abgenutscht und mit 50 ml Wasser gewaschen. Das Rohprodukt löst man in 150 ml Eisessig und lässt 14-16 h absetzen. Das ausgefallene Produkt wird abgenutscht und mit 100 ml Ether gewaschen.

Ausbeute: 4,206 g (18,8 mmol, 26,9 %) 3-Acetamino-2-nitro-benzoesäure (**96**),
braun-rotes Pulver (MW: 224,17 g/mol).

R_f: 0,24 [Essigester]



¹H-NMR-Spektrum (DMSO-d₆):

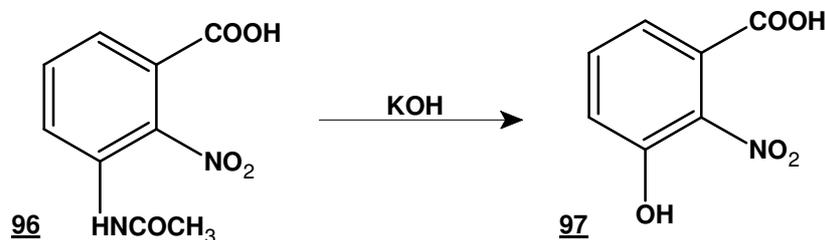
δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
13,88	bs, 1 H		-COOH
9,97	s, 1 H		NH
7,73	m, 2 H		C6H und C4H
7,66	t, 1H	$^3J_{\text{H,H}} = 7,7 \text{ Hz}$	C5H
2,02	s, 3 H		CH ₃

¹³C-NMR-Spektrum (DMSO-d₆):

δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
169,4	s		-COOH
165,2	s		-COMe
144,5	s		C2
131,4	d	$^1J_{\text{C,H}} = 168 \text{ Hz}$	C5
130,5	s		C3

127,2	d	$^1J_{C,H} = 164 \text{ Hz}$	C4 und C6
126,4	s		C1
23,1	t	$^1J_{C,H} = 129 \text{ Hz}$	-CH ₃

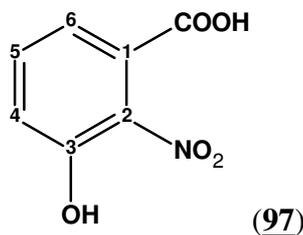
6.6.3.2 Herstellung von 3-Hydroxy-2-nitro-benzoesäure (97)



171 g 86 %-ige KOH (2,621 mol) werden in 440 ml H₂O gelöst. In die warme Lösung werden 18,9 g (84,3 mmol) 3-Acetamino-2-nitrobenzoesäure 96 eingetragen und 4 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wird durch Zugabe von konz. HCl ein pH-Wert von 3,5-4 eingestellt und anschließend mit Aktivkohle gereinigt. In einer Extraktionsapparatur wird mindestens 24 h mit Essigester extrahiert. Anschließend wird das Lösungsmittel abdestilliert.

Ausbeute: 13,137 g (71,7 mmol, 85,1 %) 3-Hydroxy-2-nitro-benzoesäure (97),
gelb-braunes Pulver (MW: 183,12 g/mol).

R_f: 0,64 [Hexan/Essigester 3:1]

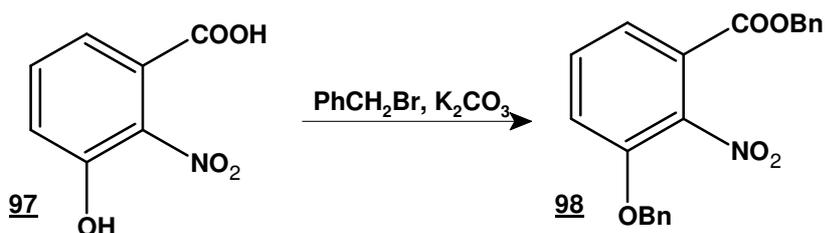


¹H-NMR-Spektrum (DMSO-d₆):

δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
13,27	1H, bs		-COOH
11,24	1H, bs		OH
7,46	1H, t	$^3J_{H,H} = 7,9 \text{ Hz}$	C5H
7,38	1H, dd	$^3J_{H,H} = 7,7 \text{ Hz};$ $^4J_{H,H} = 1,1 \text{ Hz}$	C6H
7,29	1H, dd	$^3J_{H,H} = 8,1 \text{ Hz};$ $^4J_{H,H} = 1,0 \text{ Hz}$	C4H

¹³C-NMR-Spektrum (DMSO-d₆):

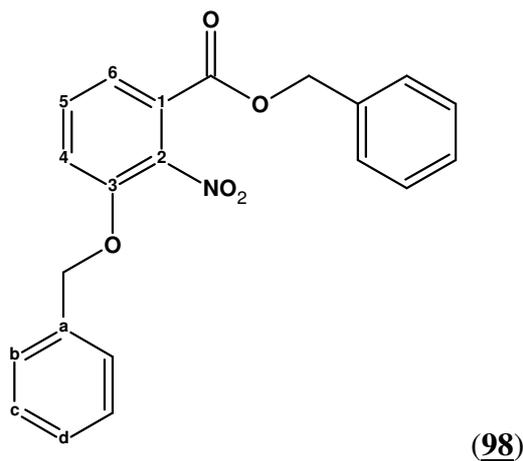
δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
164,6	s		-COOH
149,4	s		C3
139,5	s		C2
131,3	d	$^1J_{C,H} = 166 \text{ Hz}$	C5
124,7	s		C1
121,8	d	$^1J_{C,H} = 166 \text{ Hz}$	C6
120,6	d	$^1J_{C,H} = 169 \text{ Hz}$	C4

6.6.3.3 Herstellung von 3-Benzyloxy-2-nitro-benzoessäurebenzylester (**98**)

Zu 20 ml Dimethylformamid, 2 g (11 mmol) 3-Hydroxy-2-nitro-benzoessäure **97** und 4,5 g (32 mmol) K_2CO_3 gibt man bei Raumtemperatur unter Rühren 4,48 g (3,111 ml; 26 mmol) Benzylbromid. Nach 14 h Rühren wird das Reaktionsgemisch mit 200 ml Wasser verdünnt und 3-mal mit 200 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser und einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Nach Abrotieren des Lösungsmittels wird aus Ether umkristallisiert.

Ausbeute: 3,115 g (8,5 mmol, 78 %) 3-Benzyloxy-2-nitro-benzoessäurebenzylester (**98**), farblose Kristalle (MW: 363,36 g/mol).

R_f: 0,4 [Hexan/Essigester 3:1]



¹H-NMR-Spektrum (DMSO-d₆):

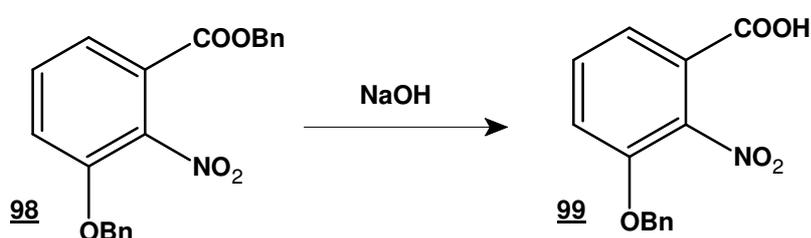
δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
7,73	1H, pd	$^3J_{H,H} = 7,3$ Hz	C6H
7,66	1H, pt	$^3J_{H,H} = 8,1$ Hz	C5H
7,60	1H, pd	$^3J_{H,H} = 7,8$ Hz	C4H
7,43-7,33	10H, m		C _{Ph} H
5,32	4H, s		2 CH ₂ -Ph

¹³C-NMR-Spektrum (DMSO-d₆):

δ [ppm]	Zuordnung
162,5	-COO
149,6	C3
140,4	C2
135,7	Ca
135,3	Ca'

132,0	C5
128,8	Cc
128,7	Cc'
128,6	Cd'
128,5	Cd
128,4	Cb'
127,7	Cb
122,8	C1
122,3	C6
120,2	C4
70,9	C3-O-CH ₂ Ph
67,7	COO-CH ₂ Ph

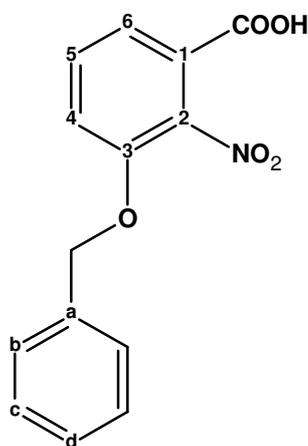
6.6.3.4 Herstellung von 3-Benzyloxy-2-nitro-benzoessäure (99)



In 70 ml Methanol und 70 ml Dioxan löst man unter Erhitzen (60 °C) 3,1 g (8,5 mmol) 3-Benzyloxy-2-nitro-benzoessäurebenzyloxyester (98) und tropft anschließend 15 ml einer 2,5 N NaOH hinzu. Die Umsetzung wird dünnschichtchromatographisch verfolgt bis keine Ausgangsverbindung mehr zu erkennen ist. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf 90 ml eingengt, gekühlt und mit konzentrierter Salzsäure angesäuert (pH 5). Es bildet sich ein weißer Niederschlag. Das ausgefallene Produkt wird abgenutscht, mit Wasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet.

Ausbeute: 1,974 g (7,2 mmol, 85 %) 3-Benzyloxy-2-nitro-benzoessäure (99), farblose Kristalle (MW: 273,24 g/mol).

R_f: 0,13 [Hexan/Essigester 1:3]



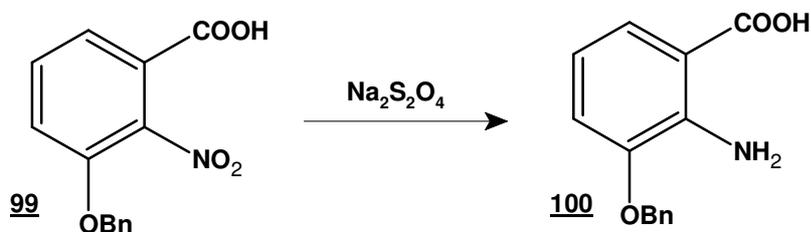
(99)

¹H-NMR-Spektrum (DMSO-d₆):

δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
13,95	1 H, s		-COOH
7,66	1H, d	³ J _{H,H} = 7,4 Hz	C6H
7,63	1H, t	³ J _{H,H} = 7,9 Hz	C5H
7,55	1H, d	³ J _{H,H} = 7,5 Hz	C4H
7,42-7,30	5H, m		C _{Ph} H
5,30	2H, s		CH ₂ Ph

¹³C-NMR-Spektrum (DMSO-d₆):

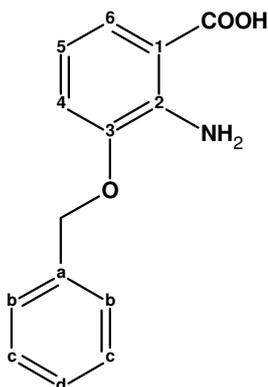
δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
164,2	s		-COOH
149,4	s		C3
140,7	s		C2
135,8	s		Ca
131,6	d	¹ J _{C,H} = 167 Hz	C5
128,8	d	¹ J _{C,H} = 160 Hz	Cc
128,4	d	¹ J _{C,H} = 161 Hz	Cd
127,7	d	¹ J _{C,H} = 160 Hz	Cb
124,4	s		C1
122,4	d	¹ J _{C,H} = 169 Hz	C6
119,4	d	¹ J _{C,H} = 167 Hz	C4
70,8	t	¹ J _{C,H} = 147 Hz	C3-O-CH ₂ Ph

6.6.3.5 Herstellung von 2-Amino 3-benzyloxy-benzoessäure (100)

150 g (0,78 mol) Natriumdithionit (Na₂S₂O₄) werden in 400 ml Wasser gelöst und während einer Stunde bei Raumtemperatur zu einer Lösung bestehend aus 27,3 g (0,1 mol) 3-Benzyloxy-2-nitrobenzoessäure **99** und 500 ml 2 N NaOH zugetropft. Anschließend wird das Reaktionsgemisch für 2 Stunden unter Rühren auf 100°C erhitzt. Nach Abkühlen wird das Reaktionsgemisch, bis sich ein weißer Niederschlag bildet, mittels konz. Salzsäure angesäuert (pH 3,5 – 4). Das Reaktionsgemisch wird mit Ether extrahiert, die organische Phase mittels Wasser und einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet.

Ausbeute: 17,271 g (71,0 mmol, 71 %) 2-Amino 3-benzyloxy-benzoessäure (**100**), farblose Kristalle (MW: 243,26 g/mol).

R_f: 0,80 [Hexan/Essigester 1:3]



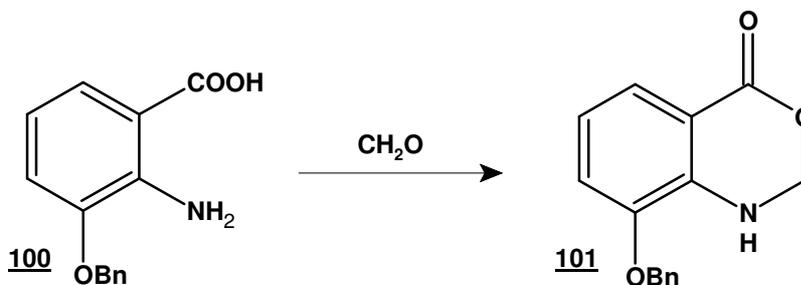
(100)

¹H-NMR-Spektrum (DMSO-d₆):

δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
7,48	2H, d	³ J _{H,H} = 7,5 Hz	C _{Ph} H _b
7,39	2H, t	³ J _{H,H} = 7,5 Hz	C _{Ph} H _c
7,33	2H, d	³ J _{H,H} = 7,3 Hz	C ₆ H, C _{Ph} H _d
7,03	1H, d	³ J _{H,H} = 7,8 Hz	C ₄ H
6,47	1H, t	³ J _{H,H} = 8,0 Hz	C ₅ H
5,13	2H, s		-CH ₂ Ph

¹³C-NMR-Spektrum (DMSO-d₆):

δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
169,9	s		-COOH
145,7	s		C ₃
142,2	s		C _a
137,2	s		C ₂
128,6	d	¹ J _{C,H} = 160 Hz	C _c
128,0	d	¹ J _{C,H} = 161 Hz	C _d
127,7	d	¹ J _{C,H} = 159 Hz	C _b
123,1	d	¹ J _{C,H} = 162 Hz	C ₆
115,1	d	¹ J _{C,H} = 158 Hz	C ₄
113,9	d	¹ J _{C,H} = 163 Hz	C ₅
110,0	s		C ₁
69,83	t	¹ J _{C,H} = 145 Hz	C ₃ -O-CH ₂ Ph

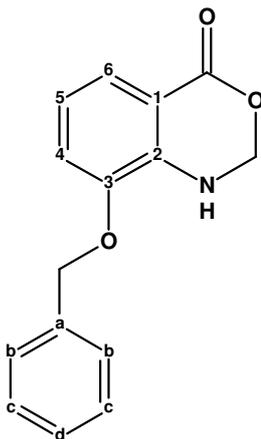
6.6.3.6 Herstellung von 3-Benzyloxy-anthranilsäure-formalid (101)

In einem Gemisch bestehend aus 100 ml Methanol und 20 ml Dioxan werden 8,26 g (34 mmol) 2-Amino-3-benzyloxy-benzoensäure 100 gelöst und anschließend nach Zugabe von

6,9 g Formaldehyd (37%, 85 mmol) wird für 3 Stunden bei 60°C gerührt. Nach Abkühlen wird die Lösung eingengt bis ein weißer Niederschlag entsteht. Nach Auskristallisation wird das Lösungsmittel abgenutscht, der Niederschlag mit kaltem Methanol gewaschen und anschließend getrocknet.

Ausbeute: 6,509 g (25,5 mmol, 75 %) 3-Benzyloxy-anthranilsäure-formalid (**101**), farblose Kristalle (MW: 255,27 g/mol).

R_f: 0,56 [Hexan/Essigester 1:1]



(**101**)

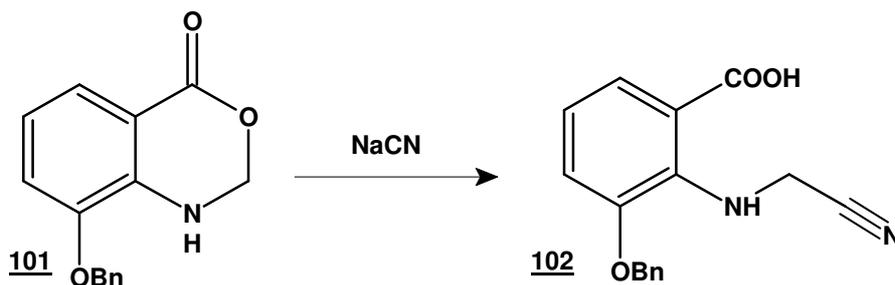
¹H-NMR-Spektrum (DMSO-d₆):

δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
7,46	2H, pd	³ J _{H,H} = 6,7 Hz	C6H, C _{Ph} Hd
7,40 - 7,30	5H, m		C4H, C _{Ph} Hc, C _{Ph} Hd
7,13	1H, t	³ J _{H,H} = 8,1 Hz	C5H
5,31	2H, s		CH ₂
5,19	2H, s		-CH ₂ Ph

¹³C-NMR-Spektrum (DMSO-d₆):

δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
163,8	s		-COO-
150,2	s		C3
136,5	s		C2 od. Ca
135,6	s		C2 od. Ca
128,7	d	¹ J _{C,H} = 161 Hz	Cc
128,3	d	¹ J _{C,H} = 161 Hz	Cd
128,1	d	¹ J _{C,H} = 158 Hz	Cb
124,7	d	¹ J _{C,H} = 164 Hz	C6
121,9	s		C1
121,4	d	¹ J _{C,H} = 166 Hz	C4
118,0	d	¹ J _{C,H} = 163 Hz	C5
83,2	t	¹ J _{C,H} = 158 Hz	-CH ₂ -
81,0	t	¹ J _{C,H} = 166 Hz	C3-O-CH ₂ Ph

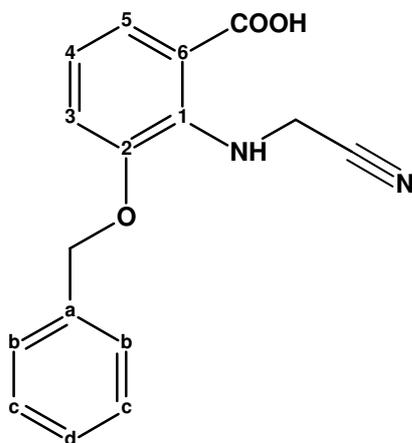
6.6.3.7 Herstellung des *N*-(2-Benzoyloxy-6-carboxyphenyl)-glycin-nitrils (**102**)



1,866 g (7,3 mmol) 3-Benzoyloxy-anthranilsäure-formalid **101** und 2,5 g (51 mmol) Natriumcyanid werden in 25 ml Wasser und 70 ml Dioxan gelöst und für 4 Stunden bei 60° C gerührt. Nach Einengen wird die Reaktionslösung mit 6 N HCl auf pH 2-3 eingestellt bis sich ein weißer Niederschlag bildet. Der entstandene Niederschlag wird abgenutscht, mit kaltem Wasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet.

Ausbeute: 1,628 g (5,8 mmol, 79 %) *N*-(2-Benzoyloxy-6-carboxyphenyl)-glycin-nitrils (**93**), farblose Kristalle (MW: 282,29 g/mol).

R_f: 0,48 [Hexan/Essigester 1:1]



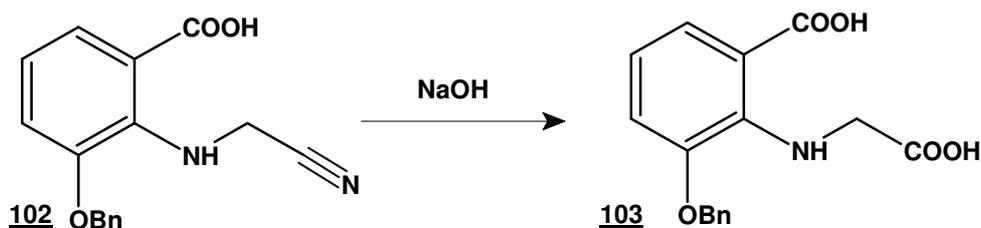
(**102**)

¹H-NMR-Spektrum (DMSO-d₆):

δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
13,19	1H, s		-COOH
7,71	1H, bs		-NH
7,51-7,48	3H, m		C _{Ph} H
7,42-7,38	2H, m		C _{Ph} H
7,34	1H, d	³ J _{H,H} = 7,0 Hz	C5H
7,26	1H, d	³ J _{H,H} = 7,9 Hz	C3H
6,85	1H, t	³ J _{H,H} = 8,1 Hz	C4H
5,16	2H, s		-CH ₂ Ph
4,44	2H, s		-CH ₂ CN

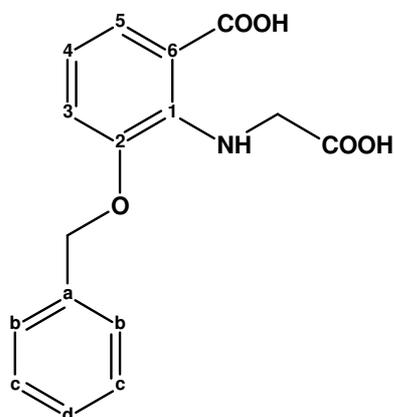
¹³C-NMR-Spektrum (MeOH-d₄):

δ [ppm]	Zuordnung
171,9	-COOH
149,0	C2
143,4	C1 od Ca
142,3	C1 od Ca
128,7	Cc
128,2	Cd
128,1	Cb
125,2	-CN
124,4	C5
115,9	C3
114,5	C4
111,9	C1
77,8	C3-O-CH ₂ Ph
35,5	-CH ₂ -CN

6.6.3.8 Herstellung von *N*-(2-Benzoyloxy-6-carboxyphenyl)-glycin (**103**)

7,75 g (193,7 mmol) NaOH werden vorsichtig in 180 ml Wasser gelöst. Zu der noch warmen Lösung wird portionsweise 5,18 g (18,4 mmol) *N*-(2-Benzoyloxy-6-carboxyphenyl)-glycynitril **102** zugegeben und anschließend für 4 Stunden bis zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen wird die Reaktionslösung mit 6 N HCl angesäuert (pH 2). Es bildet sich ein weißer Niederschlag der abfiltriert und im Exsikkator getrocknet wird.

Ausbeute: 4,379 g (14,5 mmol, 79 %) *N*-(2-Benzoyloxy-6-carboxyphenyl)-glycin (**103**), farblose Kristalle (MW: 301,29 g/mol).

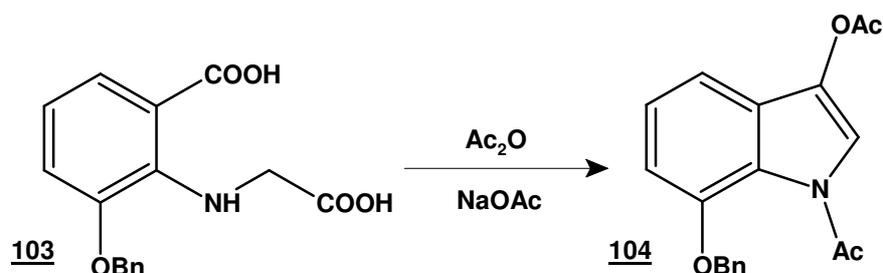
**(103)**

¹H-NMR-Spektrum (DMSO-d₆):

δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
12,75	2H, bs		2 -COOH
7,46-7,33	6H, m		C _{Ph} H + C5H
7,10	1H, d	³ J _{H,H} = 8,4 Hz	C3H
6,62	1H, t	³ J _{H,H} = 8,1 Hz	C4H
5,06	1H, s		-CH ₂ Ph
4,14	1H, s		-CH ₂ COOH

¹³C-NMR-Spektrum (DMSO-d₆):

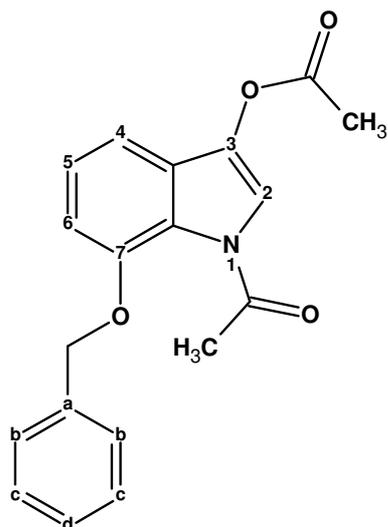
δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
173,0	s		-CH ₂ COOH
170,0	s		-C6-COOH
148,6	s		C2
142,5	s		C1 od Ca
137,1	s		C1 od. Ca
128,7	pd	¹ J _{C,H} = 160 Hz	Cc
128,1	pd	¹ J _{C,H} = 161 Hz	Cd
127,9	pd	¹ J _{C,H} = 158 Hz	Cb
124,0	d	¹ J _{C,H} = 163 Hz	C5
118,0	d	¹ J _{C,H} = 160 Hz	C3
116,7	d	¹ J _{C,H} = 163 Hz	C4
115,1	s		C6
70,7	t	¹ J _{C,H} = 145,3 Hz	-CH ₂ Ph
47,8	t	¹ J _{C,H} = 139,6 Hz	-CH ₂ COOH

6.6.3.9 Herstellung von 1,3-Diacetyl-7-benzyloxy-indoxyl (104)

2 g (24,4 mmol) Natriumacetat werden in 15 ml (160,0 mmol) Acetanhydrid suspendiert und zum Sieden erhitzt. Nach Zugabe von 1,4 g (4,6 mmol) *N*-(2-Benzyloxy-6-carboxyphenyl)-glycine 103 lässt man 5 Minuten in der Siedehitze rühren. Anschließend werden 27 ml Wasser vorsichtig zugegeben, wobei ein brauner Niederschlag ausfällt. Nach Abkühlen, extrahiert man mit Essigester, wäscht die organische Phase mit Wasser und reinigt mit Aktivkohle. Beim Einengen der Lösung kristallisiert das Produkt aus.

Ausbeute: 300,5 mg (0,9 mmol, 20 %) 1,3-Diacetyl-7-benzyloxy-indoxyl (104),
braune Kristalle (MW: 323,34 g/mol).

R_f: 0,49 [Hexan/Essigester 3:1]

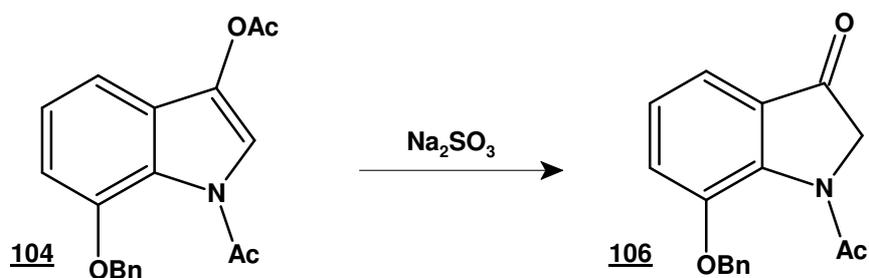


(104)

¹H-NMR-Spektrum (Aceton-d₆):

δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
7,82	1H, s		H2
7,45 - 7,37	5H, m		C _{Ph} H
7,26	1H, t	³ J _{H,H} = 7,8 Hz	H5
7,18	1H, d	³ J _{H,H} = 7,8 Hz	H4 od. H6
7,12	1H, d	³ J _{H,H} = 7,9 Hz	H4 od. H6
5,32	2H, s		-CH ₂ Ph
2,60	3H, s		-OCOCH ₃
2,37	3H, s		-NCOCH ₃

6.6.3.10 Herstellung von *N*-Acetyl-7-benzyloxy-indolin-3-on (106)



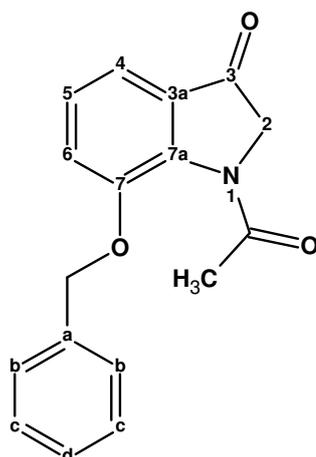
Man löst zeitgleich 339 mg (1 mmol) des 1,3-Diacetyl-7-benzyloxy-indoxyl (**104**) in 8 ml Ethanol sowie die äquimolare Menge von 133 mg (1 mmol) Natriumsulfit in 8 ml Wasser und erhitzt beide Lösungen auf 70 °C. Anschließend gießt man die wässrige zur ethanolischen Lösung und erhitzt unter Argonatmosphäre zum Sieden. Nach 20 Minuten entfernt man die Wärmequelle und lässt auf Raumtemperatur abkühlen. Anschließend wird das Lösungsmittel abrotiert und die wässrige Phase mit Essigester extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen, mit Aktivkohle gereinigt und mit Na₂SO₄ getrocknet. Nach Einengen des Lösungsmittels erhält man einen braunen Rückstand.

Aufreinigung: Der erhaltene braune Rückstand wird chromatographisch (Flash-Säulenchromatographie) aufgereinigt.

Säule: Durchmesser 2,6 cm, Länge 30,5 cm, Kieselgel, Hexan/Essigester 1:1

R_f: 0,56 [Hexan/Essigester 1:1]

Ausbeute: 50,4 mg (0,9 mmol; 17 %); *N*-Acetyl-7-benzyloxy-indolin-3-on (**106**), braune Kristalle. (MW: 281,31 g/mol)



(**106**)

¹H-NMR-Spektrum (Aceton-d₆):

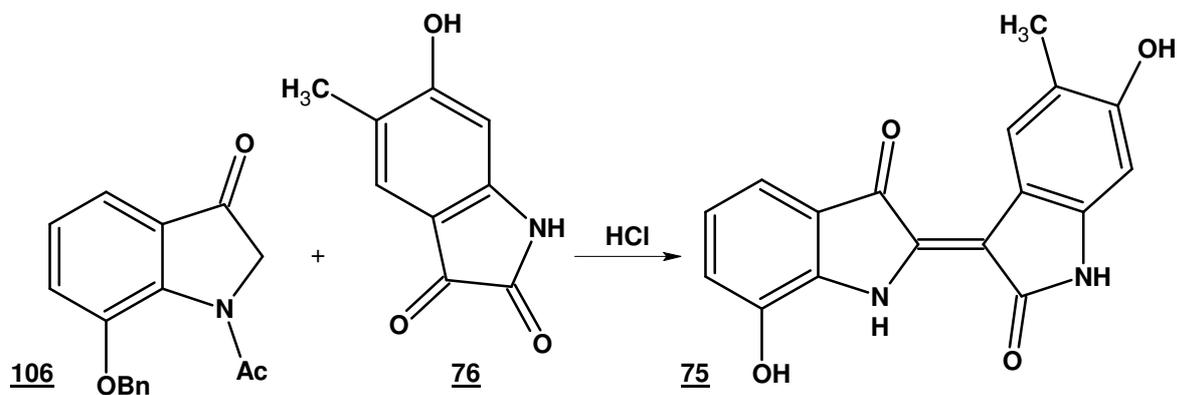
δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
7,60	2H, pd	³ J _{H,H} = 7,0 Hz	C _{Ph} H _b + C _{Ph} H _{b'}
7,49	1H, dd	³ J _{H,H} = 7,7 Hz ⁴ J _{H,H} = 1,2 Hz	H4
7,43	2H, t	³ J _{H,H} = 7,3 Hz	C _{Ph} H _c , C _{Ph} H _{c'}
7,38 - 7,36	1H, m		C _{Ph} H _d
7,31	1H, dd	³ J _{H,H} = 7,6 Hz ⁴ J _{H,H} = 1,2 Hz	H6
7,26	1H, t	³ J _{H,H} = 7,8 Hz	H5
5,31	2H, s		-OCH ₂ Ph
4,42	2H, s		CH ₂
2,27	3H, s		-NCOCH ₃

¹³C-NMR-Spektrum (DMSO-d₆):

δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
196,9	s		C3
169,7	s		-COCH ₃
150,3	s		C7
144,8	s		Ca
137,6	s		C3a
130,1	s		C7a
129,3	d	¹ J _{C,H} = 161 Hz	Cc, Cc'
128,8	d	¹ J _{C,H} = 161 Hz	Cb, Cb'
128,7	d	¹ J _{C,H} = 161 Hz	Cd
126,3	d	¹ J _{C,H} = 163 Hz	C5

121,8	d	$^1J_{C,H} = 159 \text{ Hz}$	C4
116,0	d	$^1J_{C,H} = 167 \text{ Hz}$	C6
71,8	t	$^1J_{C,H} = 145 \text{ Hz}$	-OCH ₂ Ph
58,5	t	$^1J_{C,H} = 146 \text{ Hz}$	C2
24,4	q	$^1J_{C,H} = 129 \text{ Hz}$	-CH ₃

6.6.4 Herstellung von 6,7'-Dihydroxy-5-methyl-indirubin (75)



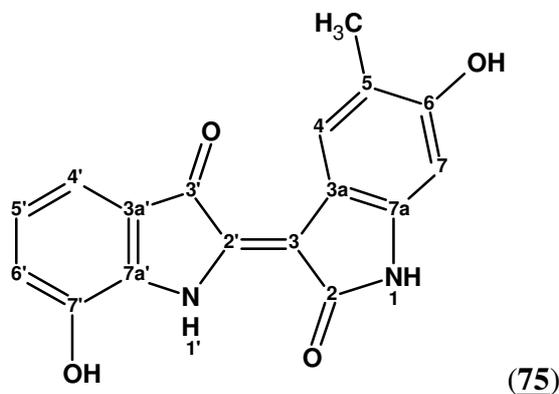
Zu 43 mg (0,15 mmol) 1-Acetyl-7-benzyloxy-indoxyl (106) und 42 mg (0,24 mmol) 5-Methylisatin 76 in 1,3 ml Essigsäure gibt man 133 μ l konzentrierte Salzsäure und erhitzt unter Argonatmosphäre. Nach 5 Stunden bei 110°C entfernt man die Wärmequelle, lässt abkühlen, gibt 5 ml Wasser dazu und extrahiert mit Essigester. Die organische Phase wird mit 1 N NaOH und Wasser extrahiert. Nach Trocknung und Einengen, erhält man einen schwarzen Rückstand.

Aufreinigung: Der erhaltene Rückstand wird chromatographisch (Flash-Säulenchromatographie) aufgereinigt.

Säule: Durchmesser 3,4 cm, Länge 29 cm, Kieselgel, Hexan/Aceton 1:1

R_f: 0,38 [Hexan/Aceton 1:1]

Ausbeute: 18 mg (0,06 mmol, 39 %); 6,7'-Dihydroxy-5-methyl-indirubin (75), dunkelblaues Pulver (MW: 308,29 g/mol).



(75)

¹H-NMR-Spektrum (DMSO-d₆):

δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
10,68	1H, s		NH1 od. NH1'
10,30	2H, s		NH1 od. NH1' und C7'-OH
9,99	1H, s		C6-OH
8,54	1H, s		C4H
7,14	1H, d	³ J _{H,H} = 7,7 Hz	C4'H
7,01	1H, d	³ J _{H,H} = 7,7 Hz	C6'H
6,85	1H, t	³ J _{H,H} = 7,7 Hz	C5'H
6,43	1H, s		C7H
2,11	1H, s		CH ₃

¹³C-NMR-Spektrum (DMSO-d₆):

δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten	Zuordnung
188,2	s		C3'
172,3	s		C2
158,0	s		C6
143,1	s		C2' od. C7'
141,5	s		C2' od. C7'
140,5	s		C7a'
135,5	s		C7a
127,8	d	¹ J _{C,H} = 158 Hz	C4
122,5	d	¹ J _{C,H} = 160 Hz	C6'
121,8	d	¹ J _{C,H} = 163 Hz	C5'
121,0	s		C3a'
116,7	s		C5
115,1	d	¹ J _{C,H} = 165 Hz	C4'
113,0	s		C3a
108,9	s		C3
97,5	d	¹ J _{C,H} = 161 Hz	C7
16,3	q	¹ J _{C,H} = 127 Hz	-CH ₃

7 Literaturverzeichnis

- Aklilu M**, Kindler HL, Donehower RC, Mani S, Vokes EE (2003) Phase II study of flavopiridol in patients with advanced colorectal cancer, *Annals of Oncology* **14**: 1270-1273.
- Alberts B**, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1995) *Molekularbiologie der Zelle*, 3. Auflagen, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- Alessi F**, Quarta S, Savio M, Riva F, Rossi L, Stivala LA, Scovassi AI, Meijer L, Prosperi E (1998) The Cyclin-dependent Kinase Inhibitors Olomouvine and Roscovitine Arrest Human Fibroblasts in G1 Phase by Specific Inhibition of CDK2 Kinase Activity, *Experimental Cell Research* **245**: 5-15.
- Alvarez A**, Guzmán A, Ruiz A, Velarde E (1992) Synthesis of 3-Arylpyrroles and 3-Pyrrolylacetylenes by Palladium-Catalyzed Coupling Reactions, *J Org Chem* **57**: 1653-1656.
- Ayrton J**, Plumb R, Leavens WJ, Mallet D, Dickins M, Dear GJ (1998) Application of a Generic Fast Gradient Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method for the Analysis of Cytochrome P450 Probe Substrates, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **12**: 217-224.
- Baeyer A** (1881) Ueber die Verbindungen der Indigogruppe, *Chem Ber* **14**: 1741-50.
- Bartsch H**, Rojas M, Alexandrov K, Camus AM, Castegnaro M, Malaveille C, Anttila S, Hirvonen K, Husgafvel-Pursiainen K, Hietanne E, Vainio H (1995) Metabolic polymorphism affecting DNA binding and excretion of carcinogens in humans, *Pharmacogenetics* **5**: 84-90.
- Barvian M**, Boschelli DH, Crossrow J, Dobrusin E, Fattaey A, Fritsch A, Fry D, Harvey P, Keller P, Garrett M, La F, Leopold W, McNamara D, Quin M, Trumpp-Kallmeyer S, Toogood P, Wu Z, Zhang E (2000) Pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7-one inhibitors of cyclindependent kinases, *J Med Chem* **43**: 4606-4616.
- Baum M** (1999) Unterschiedliche Biotransformation von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe bei Tier und Mensch als Basis für verschiedene biologische Wirksamkeit, Dissertation Universität Kaiserslautern.
- Beaudry F**, Le Blanc YJC, Coutu M, Ramier I, Moreau JP, Brown NK (1999) Metabolite profiling study of propranolol in rat using LC/MS/MS analysis, *Biomedical Chromatography*, **13**: 363-369.
- Benda P**, Lightbody J, Sato G, Levine L und Sweet W (1968) Differentiated rat glial cell strain in tissue culture, *Science* **161**: 370-371
- Blanz J**, Ehninger G, Zeller KP (1989) The isolation and identification of indigo and indirubin from urine of a patient with leukemia, *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **64**: 145-56.

- Borgne A, Meijer L** (1996) Sequential dephosphorylation of p34^{cdc2} on Thr-14 and Tyr-15 at the prophase/metaphase transition, *J Biol Chem* **271**: 27847-54.
- Borgne A, Ostvold AC, Flament S, Meijer L** (1999) Intra-M phase-promoting factor phosphorylation of Cyclin B at the prophase/metaphase transition, *J Biol Chem* **274**: 11977-86.
- Bramson HN, Corona J, Davis ST, Dickerson SH, Edelstein M, Frye SV, Gampe RT, Harris jr PA, Hassell A, Holmes WD, Hunter RN, Leckey KE, Lovejoy B, Luzzio MJ, Montana V, Rocque WJ, Rusnak D, Shewchuk L, Veal JM, Walker DH, Kuyper LF** (2001) Oxindole-Based Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinase 2 (CDK2): Design, Synthesis, Enzymatic Activities, and X-ray Crystallographic Analysis, *J Med Chem* **44**: 4339-4358.
- Brown NR, Noble MEM, Lawrie AM, Morris MC, Tunnah P, Divitas G, Johnson LN, Endicott JA** (1999) Effects of phosphorylation of threonine 160 on cyclin-dependent kinase 2 structure and activity, *J Biol Chem* **274**: 8746-56.
- Budzikiewicz H** (1998) Massenspektrometrie – Eine Einführung, 4. Ausgabe; *Wiley-VCH New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto*.
- Buolamwini JK** (2000) Cell cycle molecular targets in novel anticancer drug discovery; *Current Pharmaceutical Design* **6**: 379-392
- Carnero A, Hannon GJ** (1997) The INK4 family of CDK inhibitors, in: Vogt PK, Reed SI (ed) *Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors*, 1st ed, Springer-Verlag, Berlin: 43-56.
- Chang HM, But PPH** (1996) *Pharmacology and applications of Chinese materia medica Vol. 2*, World Scientific, Singapore.
- Chang TKH, Gonzalez FJ, Waxman DJ** (1994) Evaluation of Triacetyloleandomycin, α -Naphthoflavon and Diethyldithiocarbamate as Selective Chemical Probes for Inhibition of Human Cytochromes P450, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **311**: 437-442.
- Chellappan SP, Giordano A, Fisher PB** (1997) Role of cyclin-dependent kinases and their inhibitors in cellular differentiation and development, in: Vogt PK, Reed SI (ed) *Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors*, 1st ed, Springer-Verlag, Berlin: 57-104.
- Cresteil T** (1998) Onset of xenobiotic metabolism in children: toxicological implications; *Food Additives and Contaminants* **15**: 45-51
- Damiens E, Baratte B, Marie D, Eisenbrand G, Meijer L** (2001) Anti-mitotic properties of indirubin-3'-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor: induction of endoreplication following prophase arrest, *Oncogene* **20**: 3786-3797.
- Davies TG, Tunnah P, Meijer L, Marko D, Eisenbrand G, Endicott JA, Noble ME** (2001) Inhibitor binding to active and inactive CDK2: the crystal structure of CDK2-cyclin A/indirubin-5-sulphonate, *Structure* **5**: 389-97.
- DeBethizy JD, Hayes JR** (1994) *Metabolism: A Determinant of Toxicity*; In: Hayes A.W. (Hrsg.), *Principles and Methods of Toxicology* **3**: 59-100.

- Dole M**, Mack LL, Hines RL (1968) Molecular Beams of Macroions, *Journal of Chemical Physics* **49**: 2240-2249.
- Draetta G**, Pagano M (1996) Cell cycle control and cancer. *Annu Rep Med Chem* **31**: 241-248.
- Drees M**, Dengler WA, Roth T, Labonte H, Mayo J, Malspeis L, Grever M, Sausville EA, Fiebig HH (1997) Flavopiridol (L86-8275): selective antitumor activity *in vitro* and activity *in vivo* for prostate carcinoma cells, *Clin Cancer Res* **3**: 273-9.
- Edamatsu H**, Gau CL, Nemoto T, Guo L, Tamanoi F (2000) CDK inhibitors, roscovitine and olomoucine, synergize with farnesyl transferase inhibitor (FTI) to induce efficient apoptosis of human cancer cell lines, *Oncogene* **19**: 3059-3068.
- Eisenbrand G**, Metzler M (1994) *Toxikologie für Chemiker*; Thieme-Verlag Stuttgart, New York.
- El-Deiry WS** (1997) p21/p53, cellular growth control and genomic integrity, in: Vogt PK, Reed SI (ed) *Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors*, 1st ed, Springer-Verlag, Berlin: 121-138.
- Fang X**, Yu SX, Lu Y, Bast RC, Woodgett JR, Mills GB (2000) Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase 3 by protein kinase A, *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11960-5.
- Farbwerke** vorm. Meister Lucius & Brüning (1913) Verfahren zur Darstellung von Derivaten der Indirubine, Patentschrift: DRP 283726.
- Fenn JB**, Rossel J, Meng CK (1997) In Electrospray Ionization, How much pull does an Ion need to escape its droplet prison? *Journal of American Society for Mass Spectrometry* **8**: 1147-1157.
- 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
- Fischer PM** (2003) CDK versus GSK-3 inhibition: a purple haze no longer? *Chem Biol.* 2003 **10**:1144-6.
- Friedel A** (1998) Neue Bisindole als potente Hemmstoffe der p34cdc2-Kinase – Untersuchungen zur Biotransformation und Pharmakokinetik, Abschlußbericht, Universität Kaiserslautern.
- Fuhrer W**, Gschwend H (1979) Ortho Functionalization of Aromatic Amines: Ortho Lithiation of N-Pivaloylanilines, *J Org Chem* **44**: 1133-1136.
- Gadbois DM**, Hamaguchi JR, Swank RA, Bradbury EM (1992) Staurosporine is a potent inhibitor of p34^{cdc2} and p34^{cdc2}-like kinases, *Biochem Biophys Res Commun* **184**: 80-5.

- Gan WJ**, Yang T, Wen S, Liu Y, Tan Z, Deng C, Wu J, Liu M (1985) Studies on the mechanism of indirubin action in the treatment of chronic myelocytic leukemia (CML). II. 5'-Nucleotidase in the peripheral white blood cells of CML, *Chin Acad Med Sci Beijing* **6**: 611-613.
- Gassmann PG**, Gruetzenmacher G, van Bergen TJ (1974) Generation of azasulfonium salts from halogen-sulfide complexes and anilines. The synthesis of indoles, oxindoles, and alkylated aromatic amines bearing cation stabilizing substituents, *J Am Chem Soc* **69**: 5512-7.
- Gassmann PG**, Cue BW, Luh TY (1977) A General Method for the Synthesis of Isatins, *J Org Chem* **42**: 1344-1348.
- Gassmann PG**, Halweg KM (1979) Air Oxidation of Oxindoles to Isatins, *J Org Chem* **44**: 628-629.
- Giannis A** (2000) β -Catenin, Cyclin und mehr: neue Erkenntnisse zur Pathogenese, Behandlung und Prävention von Dickdarmkrebs, *Angew Chem* **112**: 2349-51; *Angew Chem Int Ed Engl* **39**: 2261-3.
- Gillam EMJ**, Guo Z, Ueng YF, Yamazaki H, Cock I, Reilly PEB, Hooper WD, Guengerich FP (1995) Expression of Cytochrome P450 3A5 in *Escherichia coli*: Effects of 5'-Modification, Purification, Spectral Characterization, Reconstitution Conditions, and Catalytic Activities, *Ach Bioch Bioph.* **317**.
- 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**: 533-8.
- Gray N**, Détiavaud L, Doerig C, Meijer L (1999) ATP-site directed inhibitors of cyclin-dependent kinases, *Curr Med Chem* **6**: 859-75.
- Greim H**, Deml E (1996) *Toxikologie – Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Mediziner*, VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo.
- Guengerich FG**, Shimada T (1991) Oxidation of Toxic and Carcinogenic Chemicals by Human Cytochrome P-450 Enzymes, *Chemical Research in Toxicology* **4**: 391-407.
- Guengerich FP** (1995) Analysis and characterization of enzymes, In: Hayes A.W. (Hrsg.), *Principles and Methodes in Toxicology*, Ed.3: 1259-1313.
- Guengerich FP** (1997) Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species, *Chemico-biological interactions* **106**: 161–182.
- Halkier BA** (1996) Catalytic reactivities and structure/function relationships of cytochrome P450 enzymes, *Phytochemistry* **43**: 1–21.
- Haller J** (1938a) Verfahren zur Herstellung von Dihalogenoxindolverbindungen, *DRP 0* (0), 0-0 Patentschrift D694044.

- Haller J** (1938b) Verfahren zur Herstellung von Sulfonamiden der Indolreihe, DRP 0(0), 0-0 Patentschrift 715760.
- Han J** (1988) Traditional Chinese medicine and the search for new antineoplastic drugs, *J Ethnopharmacol* **24**: 1-17.
- Han R** (1994) Highlight on the studies of anticancer drugs derived from plants in China, *Stem Cells* **12**: 53-63.
- Harbour J, Dean, D** (2000) The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms, *Genes Dev* **14**: 2393-2409.
- Hegedüs B** (1951) Zur Synthese der 3-Oxy-anthranilsäure, *Helvetica Chimica Acta* **34**: 611-614.
- Hesse M, Maier H, Zeeh B** (1995) *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 5. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Hewawasam P, Meanwell NA** (1994) A General Method for the Synthesis of Isatins: Preparation of Regiospecifically Functionalized Isatins from Anilines, *Tetrahedron Letters* **35**: 7303-7306.
- Holt SJ, Sadler PW** (1958) Studies in enzyme cytochemistry II. Synthesis of indigogenic substrates for esterases, *Proc R Soc London (B)* **148**: 481-94.
- Hössel R** (1995) Synthese biologisch aktiver Bisindole; Diplomarbeit Universität Kaiserslautern.
- Hössel R, Leclerc S, Endicott JA, Nobel MEM, Lawrie A, Tunnah P, Leost M, Damiens E, Marie D, Marko D, Niederberger E, Tang WC, Eisenbrand G, Meijer L** (1999a) Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases, *Nature Cell Biol* **1**: 60-7.
- Hössel R** (1999b) Synthese von Derivaten des Indirubins und Untersuchungen zur Mechanismusaufklärung ihrer antineoplastischen Wirkung, Dissertation Universität Kaiserslautern.
- Jautelat R, Brumby T, Schäfer M, Briem H, Eisenbrand G, Schwahn S, Krüger M, Lücking U, Prien O, Siemeister G** (2005) From the Insoluble Dye Indirubin towards Highly Active, Soluble CDK2-Inhibitors, *ChemBioChem* **6**: 531-540.
- Jeffrey D, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massagué J, Pavietich NP** (1995) Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclin A/CDK2 complex, *Nature* **376**: 313-20.
- Ji XJ, Zhang FR, Lei JL, Xu YT** (1981); Studies on the neoplastic effect and toxicity of synthetic indirubin, *Acta Pharmaceutica Sinica* **16**: 146-148.
- Johns Cupp M, Tracy TS** (1998) Cytochrome P450: New Nomenclature and Clinical Implications, *American Family Physician* **57**: 107-116.

- Keepers GP**, Piazio PE, Peters GJ, van Ark-Otte J, Winograd B, Pinedo HM (1991) Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays in vitro chemosensitivity testing, *Eur J Cancer* **27**: 897-900.
- Knockaert M**, Gray N, Damiens E, Chang YT, Grellier P, Grant K, Fergusson D, Mottram J, Soete M, Dubremetz JF, Le Roch K, Doerig C, Schultz PG, Meijer L (2000) Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors, *Chem Biol* **7**: 411-22.
- Knockaert M**, , Greengard P, Meijer L (2002) Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases, *Trends Pharmacol Sci* **23**: 417-25.
- Kondo Y**, Kojima S, Sakamoto T (1997) General and Facile Synthesis of Indoles with Oxygen-Bearing Substituents at the Benzene Moiety, *J Org Chem* **62**: 6507-6511.
- Kortmansky J**, Shah MA, Kaubisch A, Weyerbacher A, Yi S, Tong W, Sowers R, Gonen M, O'reilly E, Kemeny N, Ilson DI, Saltz LB, Maki RG, Kelsen DP, Schwartz GK (2005) Phase I Trial of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor and Protein Kinase C Inhibitor 7-Hydroxystaurosporine in Combination With Fluorouracil in Patients With Advanced Solid Tumors, *Journal of Clinical Oncology* **23**: 1875-1884.
- Kraker AJ**, Booher RN (1999) New targets in cell cycle regulation, *Annu Rep Med Chem* **34**: 247-256.
- Leclerc S**, Garnier M, Hössel R, Marko D, Bibb JA, Snyder GL, Greengard P, Biernat J, Wu YZ, Mandelkow EM, Eisenbrand G, Meijer L (2001) Indirubin inhibits glycogen synthase kinase-3 β and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease, *J Biol Chem* **276**: 251-60.
- Lee GL**, Hait WN (1985) Inhibition of growth of C6 astrocytoma cells by inhibitors of calmodulin, *Life Sciences* **36**: 347-354.
- Lee K**, Shih CY, Yang TY, Chien 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 leukaemia, *Zhinghamua Yixue Zazhi* **59**: 129-132.
- 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, *Bull Chem Soc Jpn* **69**: 1621-7.
- Li Q** (1987) The chemical constituents of Qing Dai; *Zhiwu Xuebao* **29**, 67-72.
- Liu G**, Gandara DR, Lara PN Jr, Raghavan D, Doroshow JH, Twardowski P, Kantoff P, Oh W, Kim KM, Wilding G (2004) A Phase II Trial of Flavopiridol (NSC #649890) in Patients with Previously Untreated Metastatic Androgen-Independent Prostate Cancer, *Clinical Cancer Research* Vol. **10**: 924-928.
- MacDonald JE**, Poindexter GS (1987) An anomalous Metalation of a Trimethylsilyl Group, *Tetrahedron Letters*, **28**: 1851-1852.

- Mack LL**, Kralik P, Rheude A, Dole M (1970); Molecular Beams of Macroions II; *Journal of Chemical Physics* **52**: 4977-4986.
- Malumbres M**, Barbacid, M. (2001) To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer, *Nat. Rev. Cancer* **1**: 222-231.
- Mandelkow E** (1999) The tangled tale of tau, *Nature* **402**, 588-589.
- Mansuy D** (1998) The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **121**: 5-14.
- Marko D**, Schätzle S, Friedel A, Genzlinger A, Zankl H, Meijer L, Eisenbrand G (2001) Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) by indirubin derivatives in human tumour cells, *Br J Cancer* **84**: 283-9.
- Marquardt H**, Schäfer SG (1994) *Lehrbuch der Toxikologie*; BI Wissenschaftsverlag Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich.
- Marvel CS**, Hiers GS (1941) Isatin, in: Gilman H (ed) (1941) *Organic Syntheses, Coll Vol 1*; 2nd edition, Wiley & Sons, New York, p 327-330.
- Maysinger D**, Birus M, Movrin M (1982) Stability of isatin derivatives in aqueous solution, *Pharmazie* **37**: 779-80.
- 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, cdk2 and cdk5, *Eur J Biochem* **243**: 527-36.
- Meijer L**, Kim SH (1997) Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases, *Methods Enzymol* **283**: 113-28.
- Meijer L**, Leclerc S, Leost M (1999) Properties and potential applications of chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases, *Pharmacol Ther* **82**: 279-284.
- Meijer L**, Thunnissen AMWH, White AW, Garnier M, Nikolic M, Tsai LH, Walter J, Cleverley KE, Salinas PC, Wu YZ, Biernat J, Mandelkow EM, Kim SH, Pettit GR; (2000) Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3 β and CK1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent; *Chemistry & Biology* **7**: 51-62.
- Meijer L**, Skaltsounis AL, Magiatis P, Polychronopoulos P, Knockaert M, Leost M, Ryan XP, Vonica CA, Brivanlou A, Dajani R, Crovace C, Tarricone C, Musacchio A, Roe SM, Pearl L, Greengard P (2003) GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins, *Chem Biol.* **12**:1255-66.
- Morales-Ríos MS**, Joseph-Natan P (1991) ¹H- and ¹³C-NMR-study of 1-substituted isatins and their corresponding 3-(dicyanomethylidene)indol-2-ones, *Magnetic Resonance in Chemistry* **29**: 893-6.

- Morgan DO** (1995) Principles of CDK regulation, *Nature* **374**: 131-4.
- Morgan DO** (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors, *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 261-91.
- Motokura T**, Arnold A (1993) Cyclins and oncogenesis, *Biochem Biophys Acta* **1155**: 63-78.
- Muchowski JM**, Venuti MC (1980) Ortho Functionalization of N-(tert-Butoxycarbonyl)aniline, *J Org Chem* **45**: 4798-4801.
- Mück W** (1999) Quantitative analysis of pharmacokinetic study samples by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), *Pharmazie* **54**: 639-644.
- Müller 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**: 86-90.
- Murray AW** (2004) Recycling the Cell Cycle: Cyclins Revisited, *Cell* **116**: 221-234.
- Nebert D**, McKinnon RA (1994) Cytochrome P450: Evolution and functional diversity, *Progress in liver diseases* **12**: 63-97.
- Nedelcheva V**, Gut I (1994) P450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer, *Xenobiotica* **24**: 1151-1175.
- Nelson** (2003) <http://drnelson.utmem.edu/human.P450.table.html>
- Neitzescu CD**, Raileanu D, (1958) Synthese des Heteroauxims, des Tryptamins und des Serotonins, *Chem. Ber.* **91**: 1141-1145.
- Niessen WMA** (1999) *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, 2nd Edition; Chromatographic science series Volume 79, Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hong Kong (1999)
- Omura T**, Sato R (1962) A new Cytochrome in Liver Microsomes; *Journal of Biological Chemistry*, **239**: 2370-2385.
- Pandraud H** (1961) Structure cristalline de l' isatine, *Cryst* **14**: 901-8.
- Parker PJ**, Caudwell FB, Cohen P (1983) Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle; effect of insulin on the state of phosphorylation of the seven phosphoserine residues in vivo, *Eur J Biochem* **130**: 227-34.
- Pavletich NP** (1999) Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of cdk, their cyclin activators, and cip and INK4 inhibitors, *J Mol Biol* **287**: 821-828.
- Perrin DD**, Armarego WLF (1988) *Purification of Laboratory Chemicals*, 3. Auflage, Pergamon, Oxford.

PE Sciex API 2000 Manual (1997) PESciex.

Pharmacopeia Sinica (2000), Vol. 1.

Pines J (1995) Cyclins, CDKs and Cancer, *Cancer Biology* **6**: 63-72.

Polychronopoulos P, Magiatis P, Skaltsounis AL, Myrianthopoulos V, Mikros E, Tarricone A, Musacchio A, Roe SM, Pearl L, Leost M, Greengard P, Meijer L (2004) Structural Basis for the Synthesis of Indirubins as Potent and Selective Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase-3 and Cyclin-Dependent Kinases, *J Med Chem* **47**: 935-946.

Rabiger DJ, Chang MY, Matsukawa S, Tsou KC (1970) Synthesis of 5-Iodo- and 5-Nitro-3-indolyl Phosphates as Cytochemical Substrates for Acid Phosphatase (1,2), *J Het Chem* **7**: 307-311.

Reed JN, Rotchford J, Strickland D (1988) Synthesis of 1, 2, 3, 4-Tetrahydroquinolines and 1, 2, 3, 4-Tetrahydro-1, 6-Naphthyridines by a Directed Lithiation Reaction, *Tetrahedron Letters* **29**: 5725-5728.

Reed SI (1997) Control of the G₁/S transition, *Cancer Surveys* **29**: Checkpoint and cancer: 7-23.

Rendic S, Di Carlo FJ (1997) Human cytochrome P450 enzymes: A status report summarizing their reactions, substrates, inducers and inhibitors; *Drug metabolism reviews* **29**: 413-580.

Rialet V, Meijer L (1991) A new screening test for antimetabolic compounds using the universal M phase-specific protein kinase, p34^{cdc2}/cyclin B^{cdc13}, affinity-immobilized on p13^{suc1}-coated microtitration plates, *Anticancer Res* **11**: 1581-90.

Robert Koch-Institut (2004) Krebs in Deutschland, <http://www.rki.de>.

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**: 213-228.

Rosania GR, Chang YT (2000) Targeting hyperproliferative disorders with cyclin dependent kinase inhibitors, *Expert Opin Ther Patents* **10**: 1-13.

Rowlands JC, Gustafsson JA (1997) Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction, *Critical Reviews in Toxicology* **27**: 109-134.

Rubinstein LV, Shoemaker RH, Paull KD, Simon RM, Tosini S, Skehan P, Scudiero A, Monks A, Boyd RM (1990) Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines, *J Natl Cancer Inst* **82**: 1113-8.

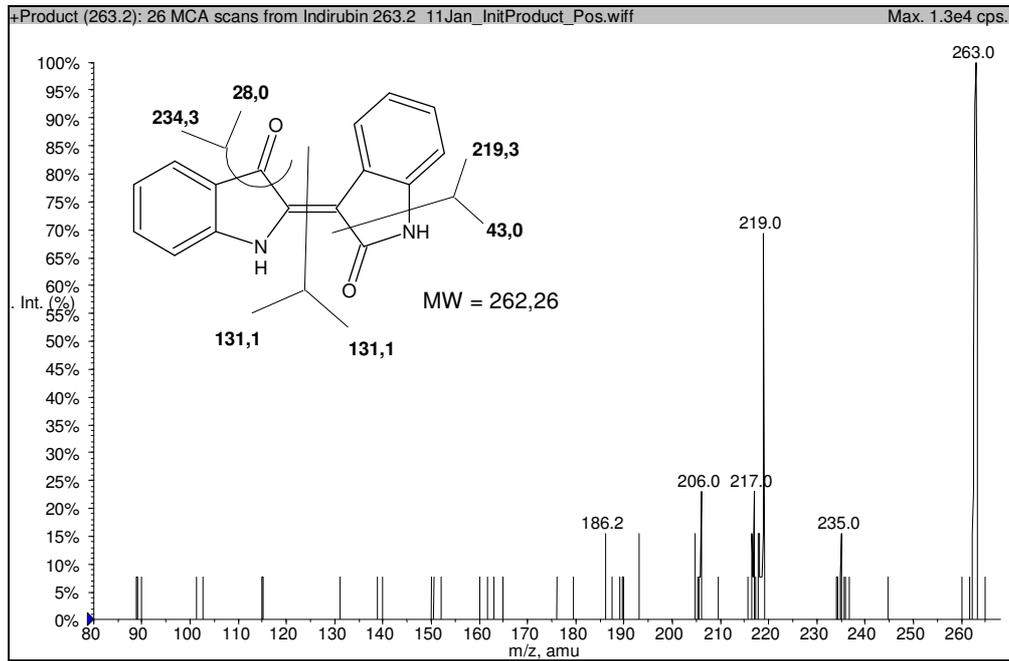
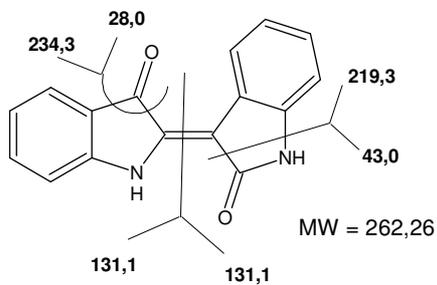
Russell GA, Kaupp G (1969) Oxidation of carbanions. IV. Oxidation of indoxyl to indigo in basic solution, *J Am Chem Soc* **91**: 3851-9.

- Russo AA**, Jeffrey D, Pavletich NP (1996) Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation, *Nature Struct Biol* **3**: 696-700.
- Sandmeyer T** (1919) Über Isonitrosoacetanilide und deren Kondensation zu Isatinen, *Helv Chim Acta* **2**: 234-42.
- Sausville EA**, Johnson J, Alley M, Zaharevitz D, Senderowicz AM (2000) Inhibition of CDKs as a therapeutic modality, *Ann N Y Acad Sci* **910**: 207-21.
- Schering AG**, (2002) CDK-Inhibitory Indirubin Derivatives having an increased solubility, WO 2002/074742.
- Schmelzeisen-Redeker**, Büttfering L, Röllgen FW (1989) Desolvation of ions and molecules in Thermospray Mass Spectrometry, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **90**: 139-150.
- Schmitt S** (2001) Metabolismus indigoider Bisindole, neuartige Hemmstoffe cyclin-abhängiger Kinasen, wissenschaftliche Abschlussarbeit/Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Schulze-Gahmen U**, Brandsen J, Jones HD, Morgan DO, Meijer L, Veselý J, Kim SH (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.
- Schwahn S** (2004) Synthese von Indirubinen mit verbesserter Bioverfügbarkeit. Untersuchungen zur antineoplastischen Wirksamkeit, Dissertation Universität Kaiserslautern.
- Sedlacek HH**, Czech J, Naid 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 J of Oncology* **9**: 1143-68.
- Senderowicz AM** (1999) Flavopiridol: the first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials, *Investigational New Drugs* **17**: 313-20.
- Senderowicz AM** (2002) The cell cycle as a target for cancer therapy: basic and clinical findings with the small molecule inhibitors flavopiridol and UCN-01, *Oncologist* **7** Suppl 3:12-9.
- Shapiro GI**, Harper JW (1999) Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control, *J Clin Invest* **104**: 1645-53.
- Shaw M**, Cohen P (1999) Role of protein kinase B and the MAP kinase cascade in mediating the EGF-dependent inhibition of glycogen synthase kinase 3 in Swiss 3T3 cells, *FEBS Lett.* **461**: 120-124.
- Sherr CJ**, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G₁-phase progression, *Genes & Development* **13**: 1501-12.
- Sherr CJ** (1996) Cancer cell cycles, *Science* **274**: 1672-7.

- Shimada T**, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP (1994) Interindividual Variations in Human Liver Cytochrome P-450 Enzymes involved in the Oxidation of Drugs, Carcinogens and Toxic Chemicals: Studies with Liver Microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **270**: 414-423.
- Sielecki TM**, Boylan JF, Benfield PA, Trainor GL. (2000) Cyclin-dependent kinase inhibitors: useful targets in cell cycle regulation, *J Med Chem* **43**: 1-18.
- Skehan P**, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *J Natl Cancer Inst* **82**: 1107-12.
- Sniekus V** (1990) Directed Ortho Metalation. Tertiary Amide and *O*-Carbamate Directors in Synthetic Strategies for Polysubstituted Aromatics, *Chem Rev* **90**: 879-933.
- Soll RM**, Guinasso Ch, Asselin A (1988) Multigram Preparation of 1,8-Diethyl-7-hydroxy-1,3,4,9-tetrahydropyrano-[3,4-b]indole-1-acetic Acid, a Phenolic Metabolite of the Analgesic and Antiinflammatory Agent Etodolac, *J Org Chem* **53**: 2844-2847.
- Soni R**, O'Reilly T, Furet P, Muller L, Stephan C, Zumstein-Mecker S, Fretz H, Fabbro D, Chaudhuri B (2001) Selective in vivo and in vitro effects of a small molecule inhibitor of cyclin-dependent kinase 4. *J Natl Cancer Inst* **93**: 436-446.
- Soule HD**, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan L (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma, *J Natl Cancer Inst* **51**: 1409-16.
- Stanetty P**, Koller H, Mihovilovic M (1992) Directed Ortho-Lithiation of Phenylcarbamic Acid 1,1-Dimethylethyl Ester (N-Boc-aniline). Revision and Improvements, *J Org Chem* **57**: 6833-6837.
- Su HCF**, Tsou KC (1960) Syntheses of Bromo-substituted Indoxyl Esters for Cytochemical Demonstration of Enzyme Activity, *J Am Chem Soc* **82**: 1187-1189.
- Tang WC**, Eisenbrand G (eds) (1992) Chinese Drugs of plant origin, 1. Auflage, Springer-Verlag, Berlin.
- Thommet A** (2001) Indirubin-Derivate: Synthese und Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen, Dissertation Universität Kaiserslautern.
- Tsuji I**, Tanaka T, Kudo T, Nishikawa T, Shinozaki K, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Takeda M (2000) Inactivation of glycogen synthase kinase-3 by protein kinase C delta: implications for regulation of tau phosphorylation, *FEBS Lett.* **469**: 111-117;
- Vesely J**, Haclicek 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, *Eur J Biochem* **224**: 771-86.
- Villerbu N**, Gaben AM, Redeuilh G, Mester J (2002) Cellular effects of purvalanol A: a specific inhibitor of cyclin-dependent kinase activities, *Int J Cancer* **97**:761-9.

- Voet D**, Voet JG (eds) (1992) Biochemie, 1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Walker DH** (1998) Small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases: molecular tools and potential therapeutics, *Curr Top Microbiol Immunol* **227**: 149-165.
- Wan JH**, You YC, Mi JX, Ying HG (1981) Effect of indirubin on hematopoietic cell production, *Acta Pharmacol Sin* **2**: 241-244.
- Webster KR** (1998) The therapeutic potential of targeting the cell cycle, *Expert Opin Inves. Drugs* **7**: 865-887.
- Whitlock JP**, Denison MS (1995) Induction of Cytochrome P450 Enzymes that metabolize Xenobiotics; In: Ortiz de Montellano (Hrsg.); *Cytochrome P450 Structure, Mechanism and Biochemistry*, Plenum Press New York 1995.
- Willoughby R**, Sheehan E, Mitrovich S (1998) A Global View of LC/MS – How to Solve your most challenging Analytical Problems, Global View Publishing, Pittsburgh, Pennsylvania.
- Wu GY**, Fang FD, Liu JZ, Chang A, Ho YH (1980) Studies on the mechanism of action of indirubin in the treatment of chronic granulocytic leukemia. I. Effects on nucleic acid and protein synthesis in human leukemic cells, *Chinese Med J* **60**: 451-454.
- Yee A**, Nichols MA, Wu L, Hall FL, Kobayashi R, Xiong Y (1995) Molecular cloning of CDK7-associated human MAT1, a cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) assembly factor, *Cancer Res* **55**: 60-6062.
- Zanger UM**, Raimundo S, Eichelbaum M (2004) Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **369**:23-37.
- Zhang ZN**, Liu EK, Zheng TL, Li DG (1985) Treatment of chronic myelocytic leukemia (CML) by traditional Chinese medicine and Western medicine alternatively, *J Trad Chinese Med* **5**: 246-248.
- Zheng QT**, Lu DJ, Yang SL (1979a) Pharmacological studies of indirubin. I. Antitumor effect, *Comm Chinese Herb Med* **10**: 35-39.
- Zheng QT**, Qi SB, Cheng ZY (1979b) Pharmacological studies of indirubin. II. Absorption, distribution and excretion of ³H-indirubin, *Comm Chinese Herb Med* **10**: 19-21.

Anhang

Abbildung 1: MS/MS von Indirubin 1Tabelle 1: Molekül- und Fragmentationen von Indirubin 1

m/z	Differenz	Interpretation
263	---	$[M+H]^+$
235	28	$[M+H]^+-CO$
219	44	$[M+H]^+-HNHCO$
217	46	$[M+H]^+-X$
206	57	$[M+H]^+-CO-HCO$
186	77	$[M+H]^+-X$

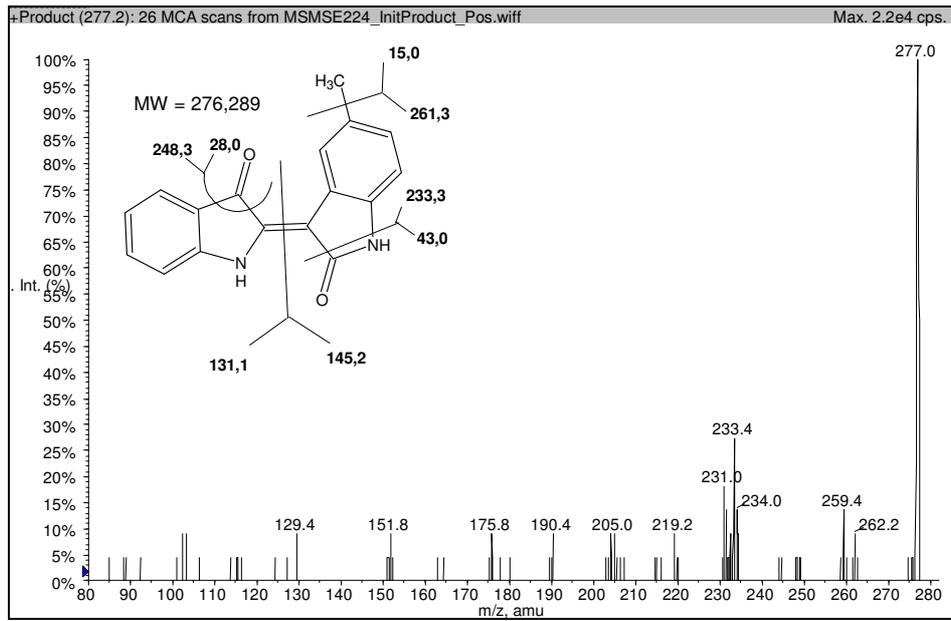


Abbildung 2: MS/MS von 5-Methylindirubin **6**

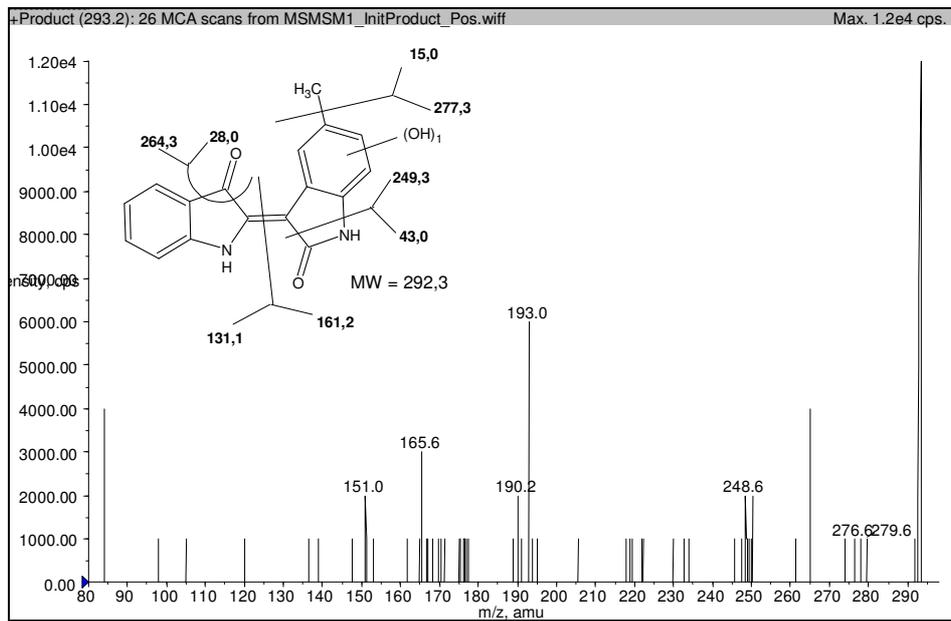


Abbildung 3a: MS/MS von M2 (Metabolit von 5-Methylindirubin **6**), Kollisionsenergie 30V

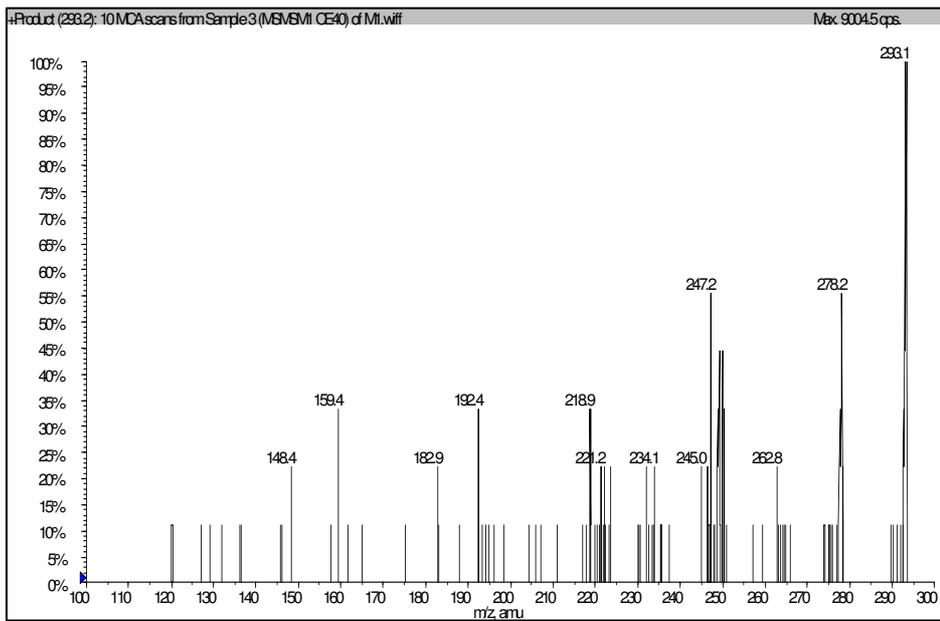


Abbildung 3b: MS/MS von M2 (Metabolit von 5-Methylindirubin **6**), Kollisionsenergie 40V

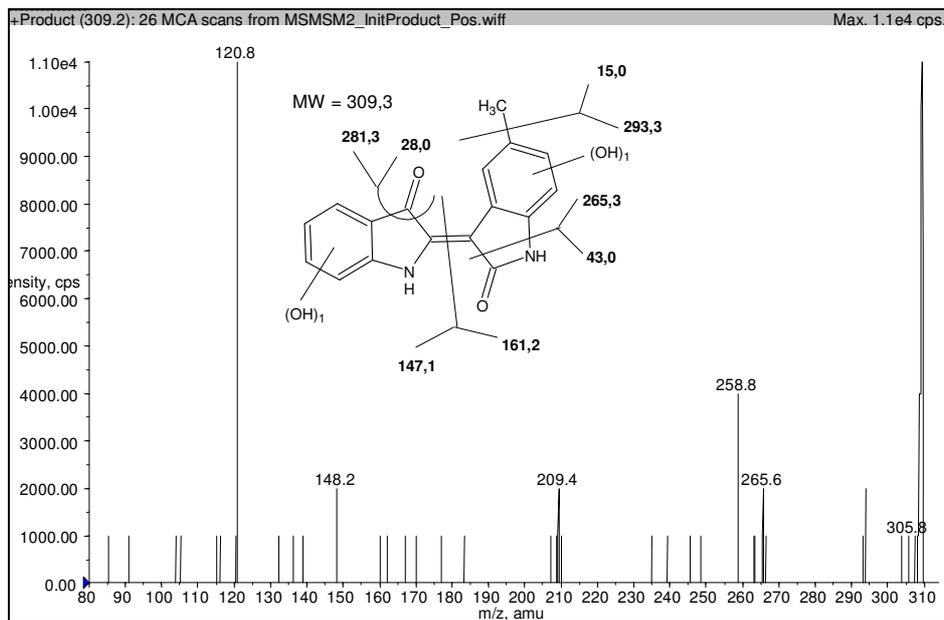


Abbildung 4: MS/MS von M3 (Metabolit von 5-Methylindirubin **6**)

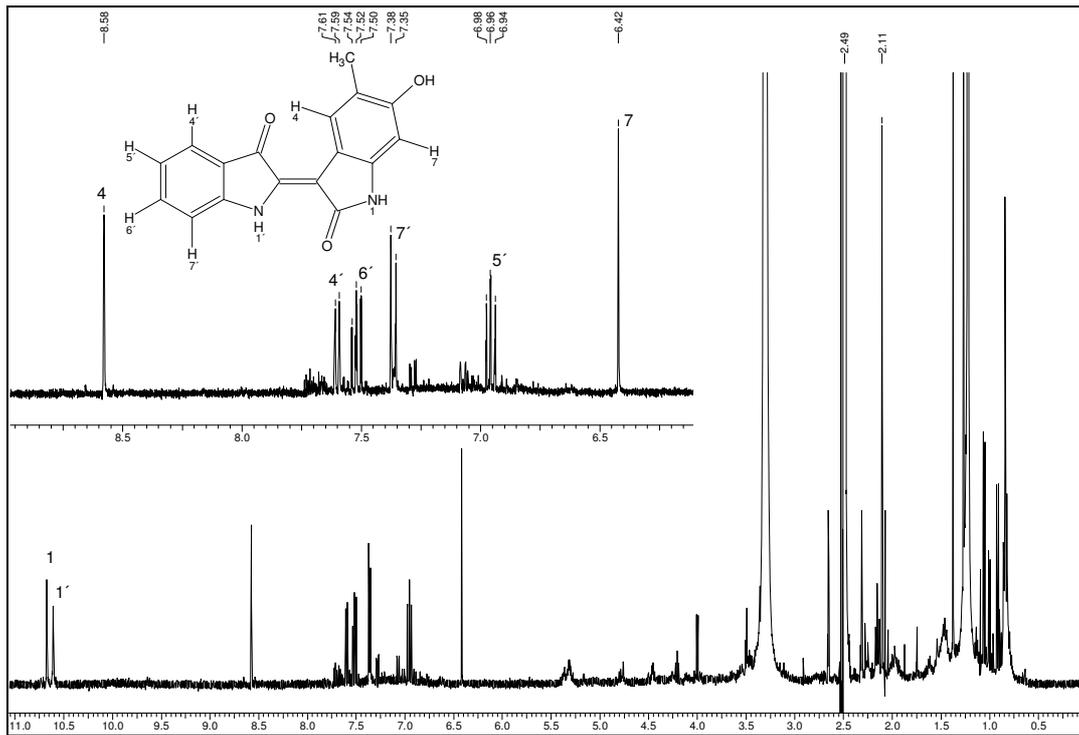


Abbildung 5: $^1\text{H-NMR}$ von Metabolit M2 (Metabolit von 5-Methylindirubin **6**)

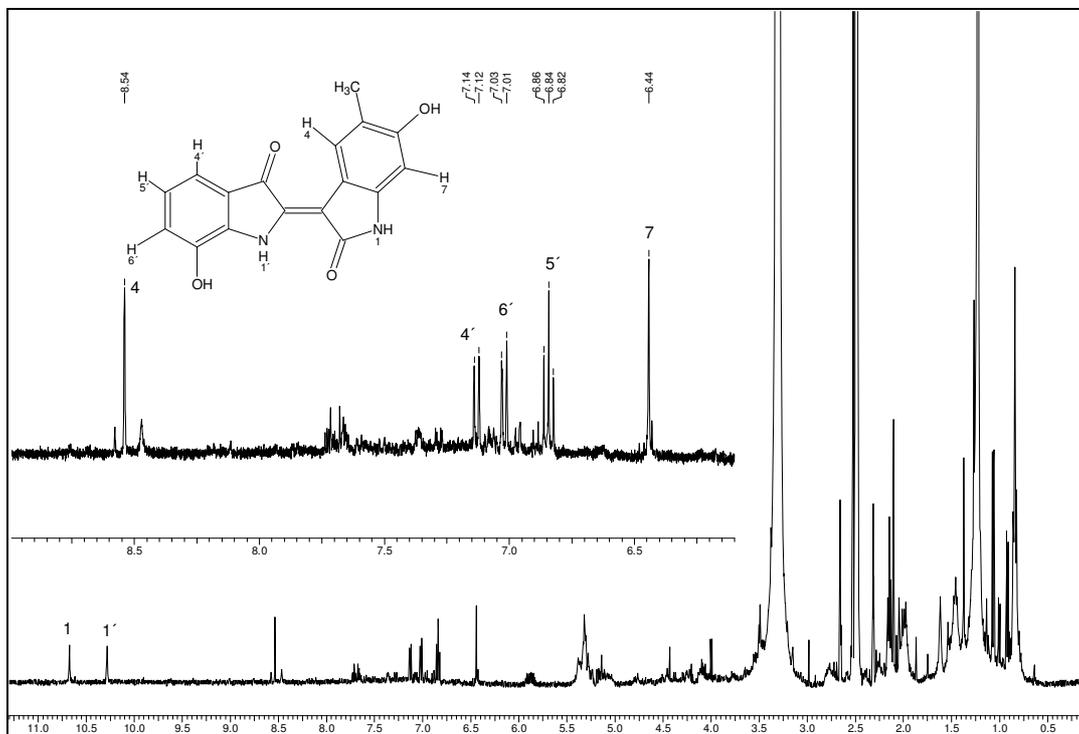
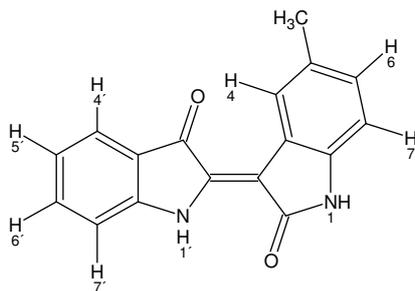
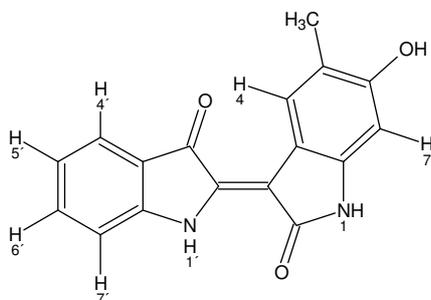


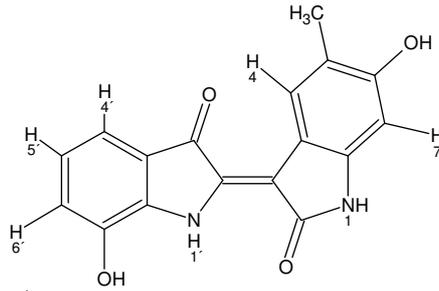
Abbildung 6: $^1\text{H-NMR}$ von Metabolit M3 (Metabolit von 5-Methylindirubin **6**)

Tabelle 2: $^1\text{H-NMR}$ -Daten von 5-Methylindirubin (DMSO- d_6 , 400,13Mhz)

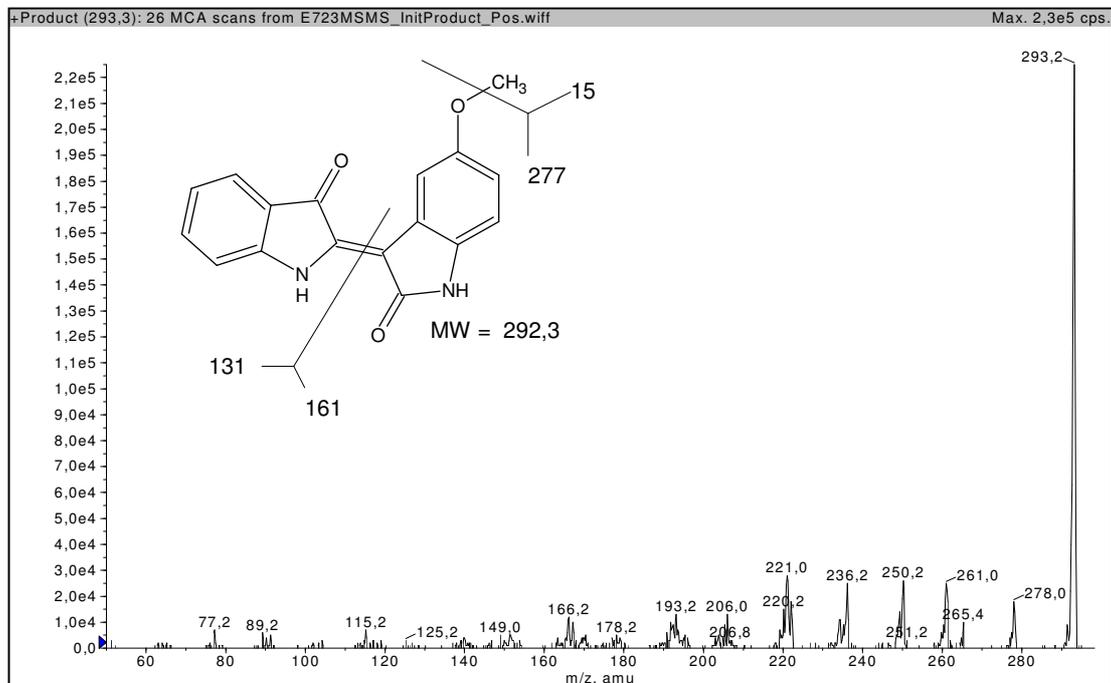
δ [ppm]	Multiplizität und Kopplungskonstante	Zuordnung
10,67 und 10,61	2 s, 1H	N(1)-H und N(1')-H
8,61	s, 1H	C4H
7,63	d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 7,6$ Hz	C4'H
7,56	t, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8,0$ Hz	C6'H
7,40	d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 7,9$ Hz	C7'H
7,05	dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 7,8$ Hz	C6H
7,00	t, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8,0$ Hz	C5'H
6,79	dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 7,9$ Hz	C7H
2,31	s, 3H	CH ₃

Tabelle 3: $^1\text{H-NMR}$ -Daten von M2 = 6-Hydroxy-5-Methylindirubin (DMSO- d_6 , 400,13Mhz)

δ [ppm]	Multiplizität und Kopplungskonstante	Zuordnung
10,68 und 10,61	2 s, 1H	-N1H od. -N1'H
8,58	d, 1H, $^4J_{\text{H,H}} = 0,76$ Hz	C4H
7,60	d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 7,72$ Hz	C4'H
7,52	t, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 7,8$ Hz	C6'H
7,36	d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8,02$ Hz	C7'H
6,96	t, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 7,72$ Hz	C5'H
6,42	d, 1H, $^4J_{\text{H,H}} = 0,76$ Hz	C7H
2,11	s, 3H	-CH ₃

Tabelle 4: $^1\text{H-NMR}$ von M3 = 6,7'-Dihydroxy-5-Methylindirubin (DMSO- d_6 , 400,13Mhz)

δ [ppm]	Multiplizität und Kopplungskonstante	Zuordnung
10,68	s, 1H	-N1 <u>H</u> od. -N1' <u>H</u>
10,28	s, 1H	-N1 <u>H</u> od. -N1' <u>H</u>
8,54	s, 1H	C4H
7,13	d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 7,8$ Hz	C4'H
7,02	pd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 7,9$ Hz	C6'H
6,84	t, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 7,72$ Hz	C5'H
6,44	s, 1H	C7H
2,11	s, 3H	CH ₃

Abbildung 7: MS/MS von 5-Methoxyindirubin **40**

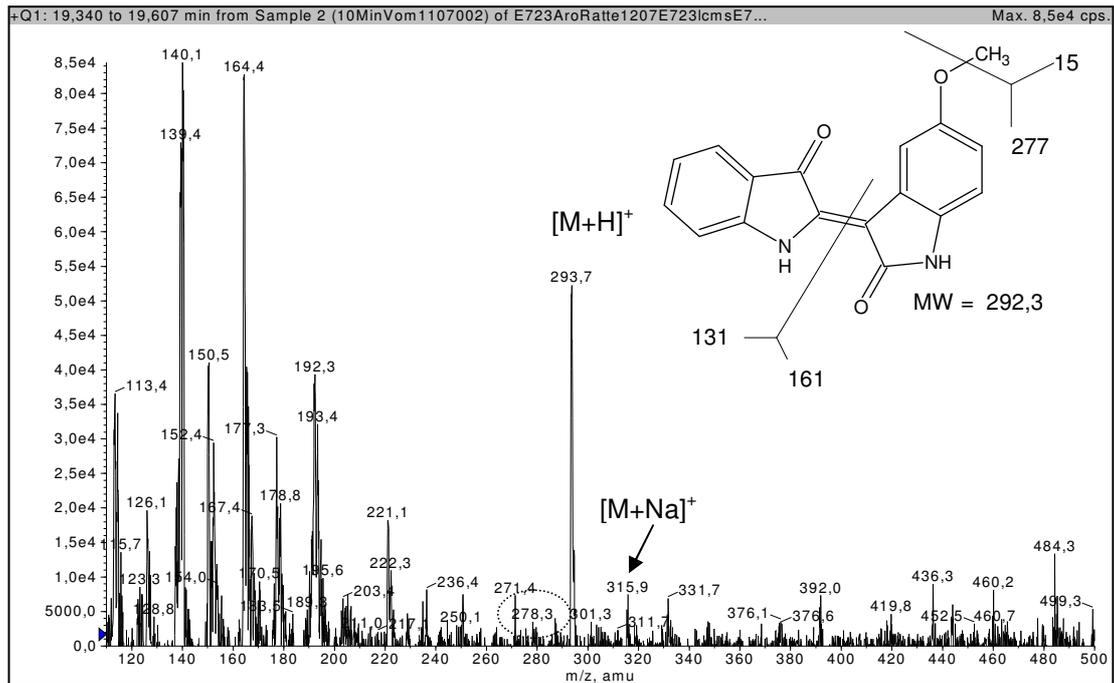


Abbildung 8: Inkubation von Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit **40**, Massenspektrum des UV-Peaks M der 10 min. Inkubation

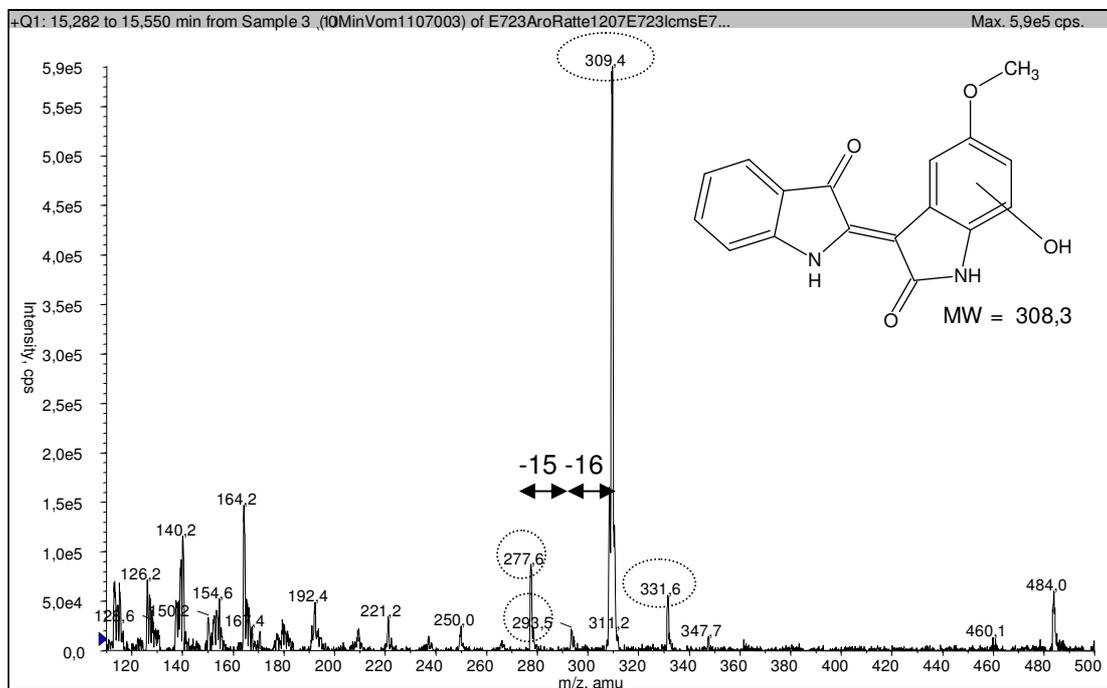
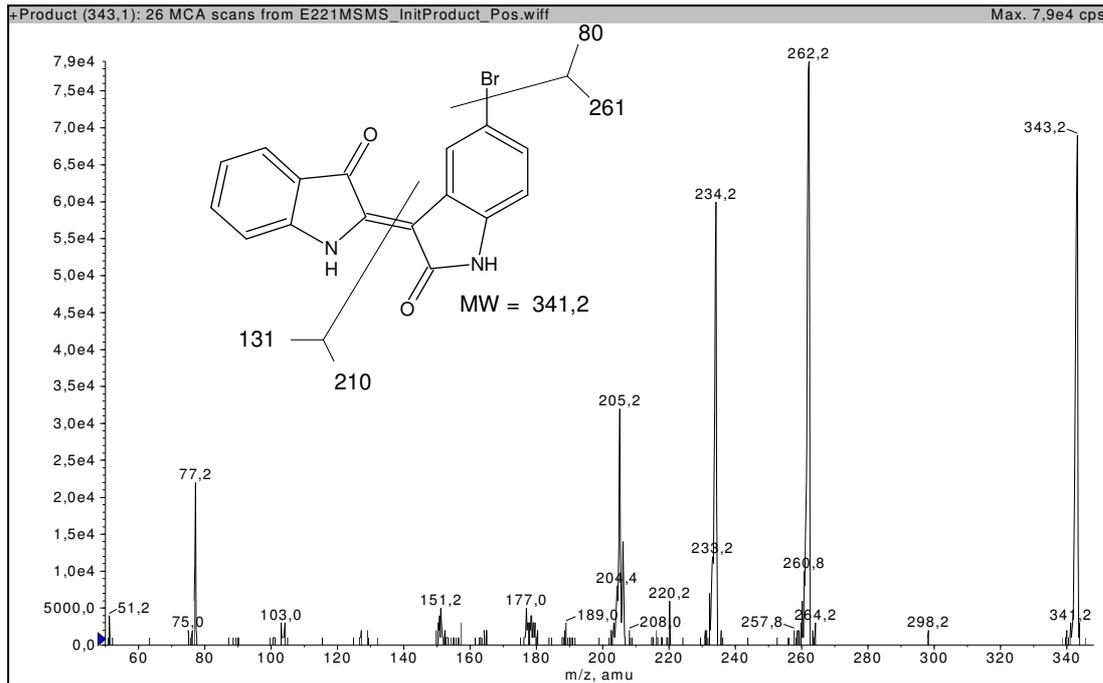
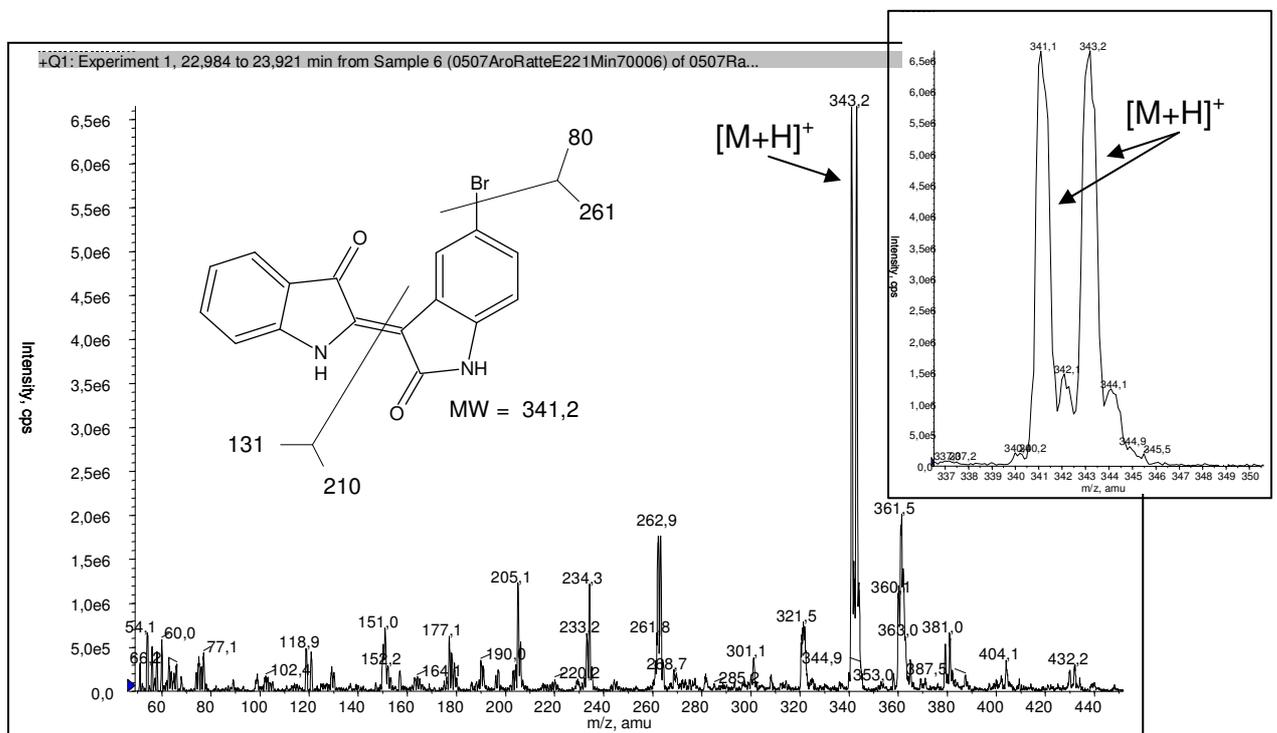


Abbildung 9: Inkubation von Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit **40**, Massenspektrum des M3 UV-Peaks der 10 min. Inkubation

Abbildung 10: MS/MS von 5-Bromindirubin **39**Abbildung 11: Inkubation von Arochlor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit **39**, Massenspektrum des intensivsten UV-Peaks M

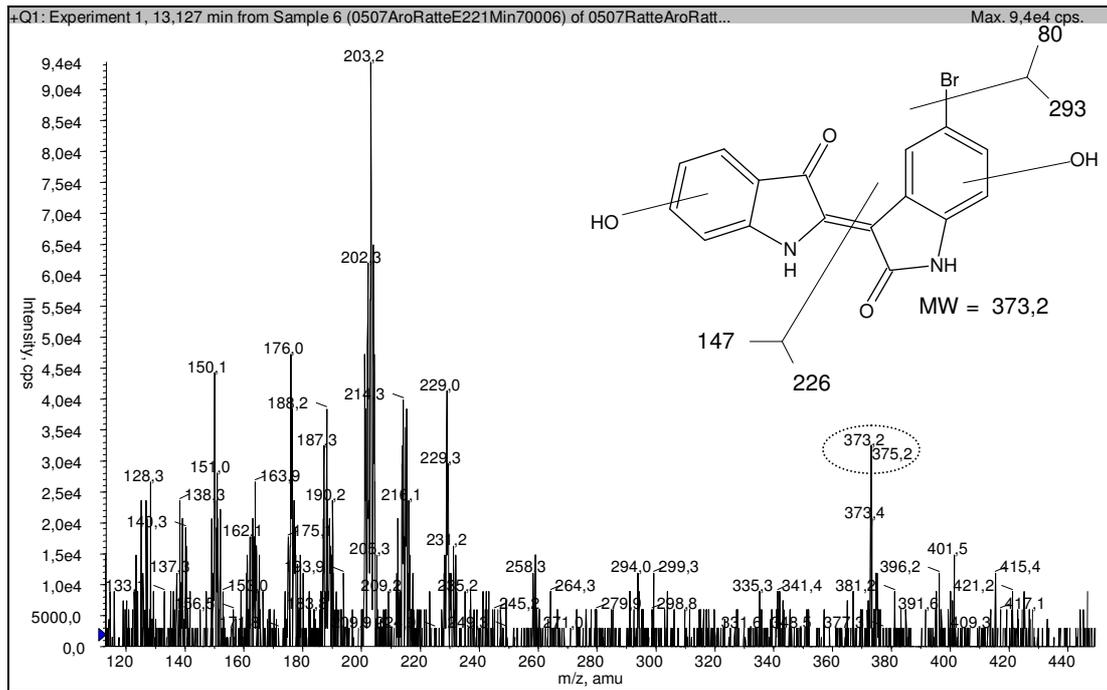


Abbildung 12: Inkubation von Arochlor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit **39**, Massenspektrum des M3 UV-Peaks.

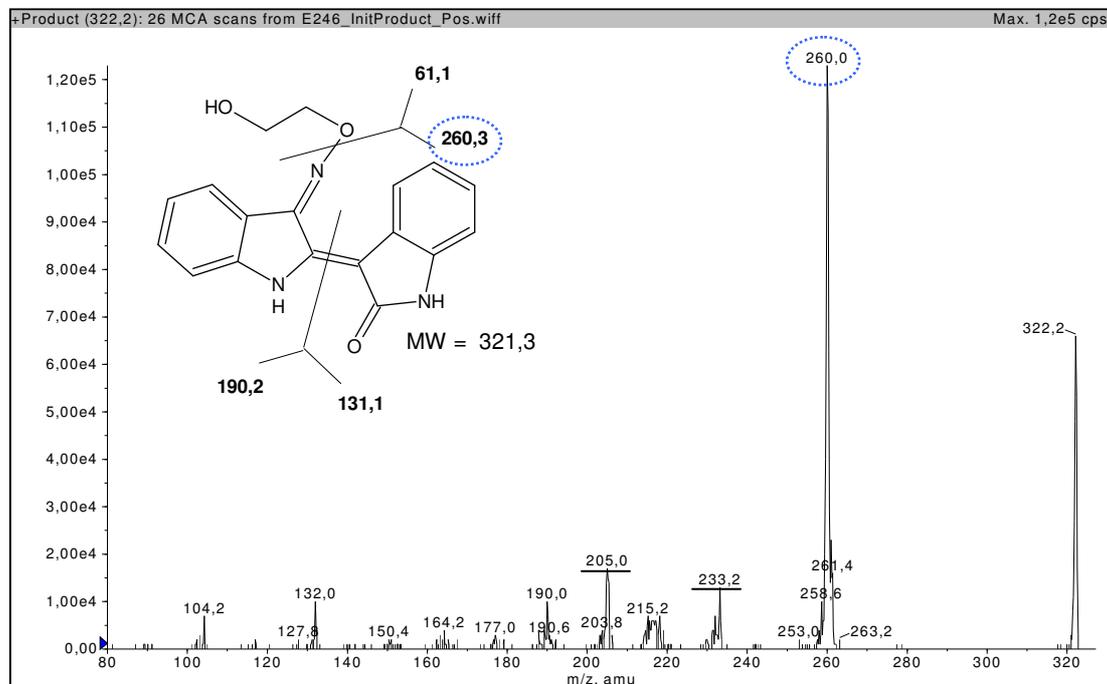


Abbildung 13: MS/MS-Spektrum von Indirubin-3'-(2-hydroxyethyl)oximether **10**

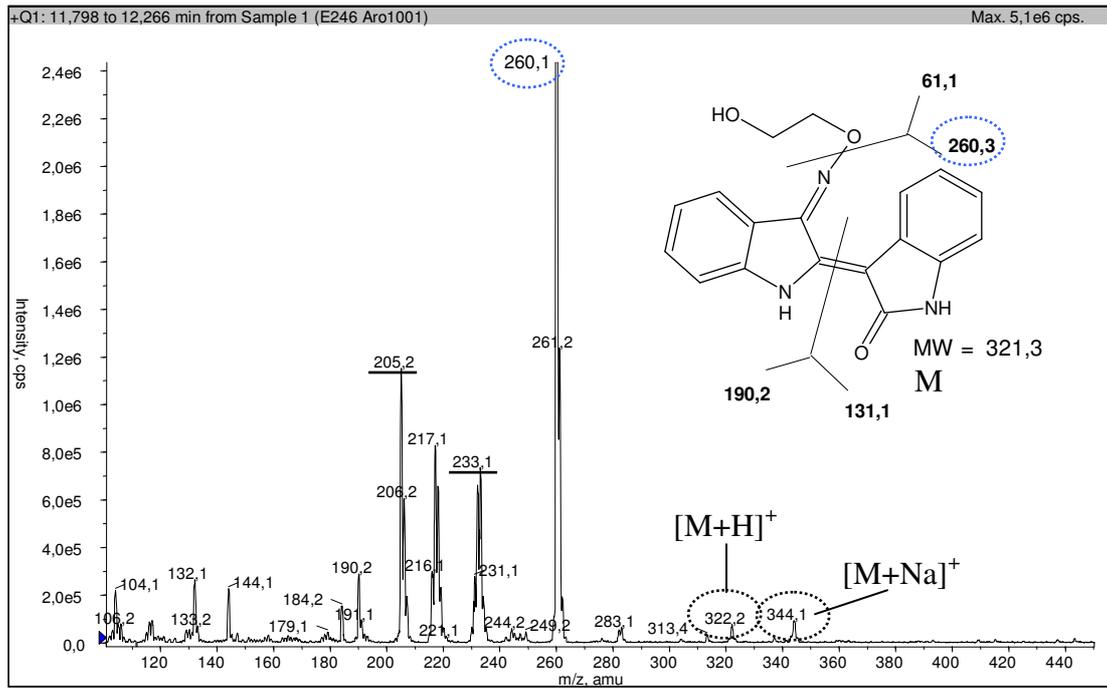


Abbildung 14: Inkubation von Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit **10**, Massenspektrum des intensivsten UV-Peaks M

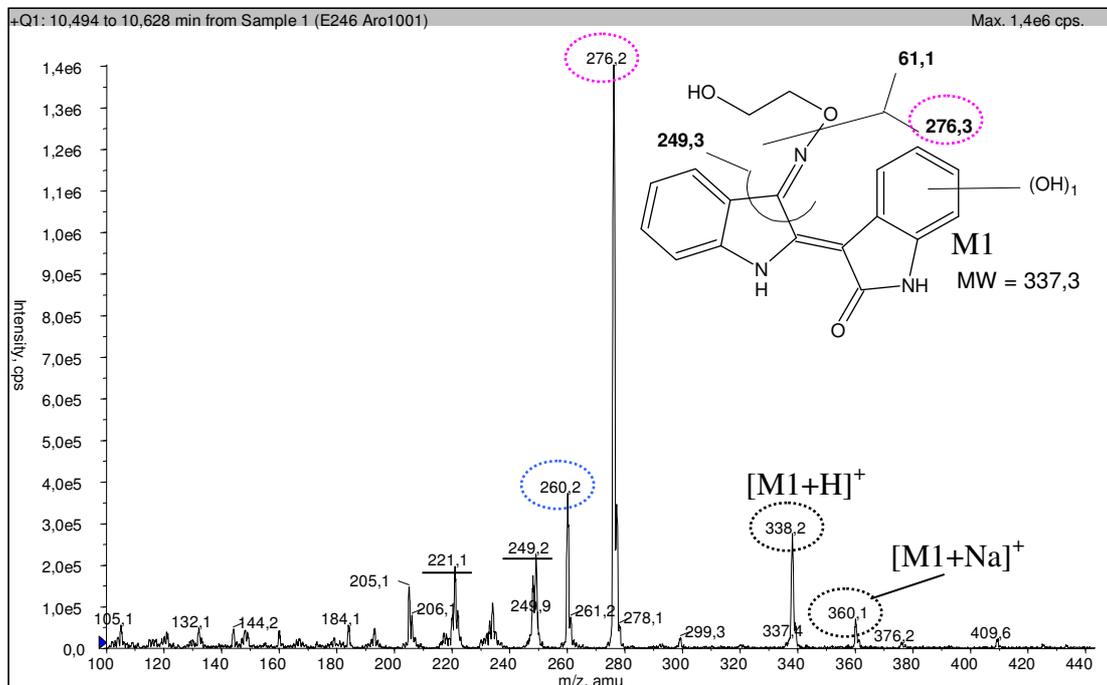


Abbildung 15: Inkubation von Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit **10**, Massenspektrum des M1 UV-Peaks.

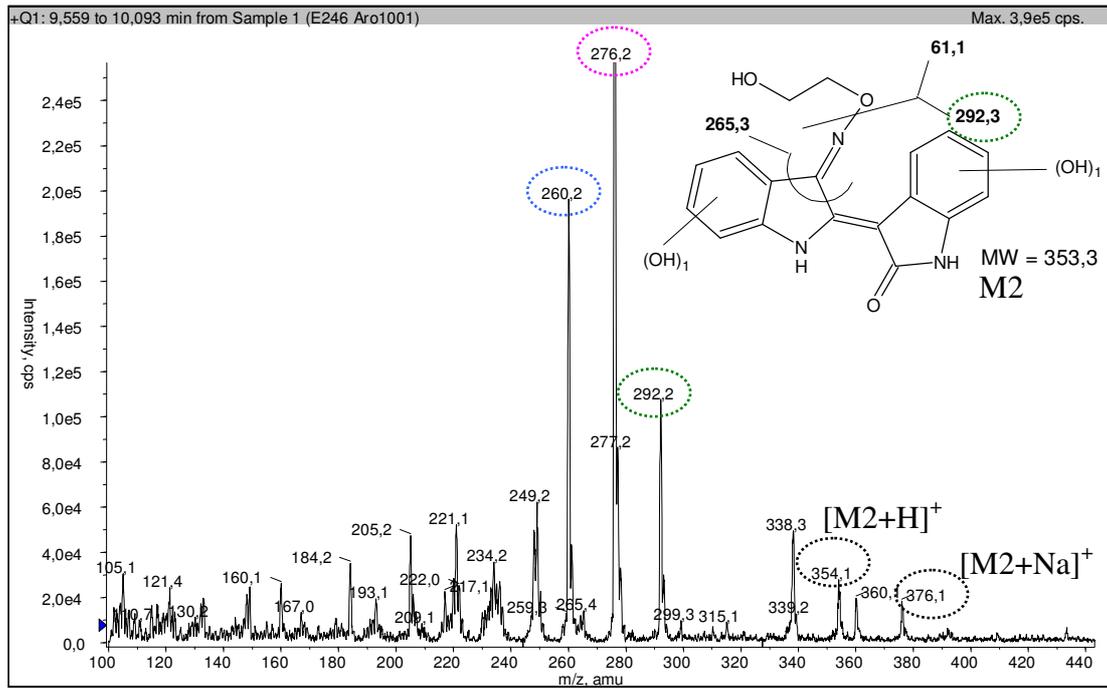


Abbildung 16: Inkubation von Arochlor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit **10**, Massenspektrum des M2 UV-Peaks

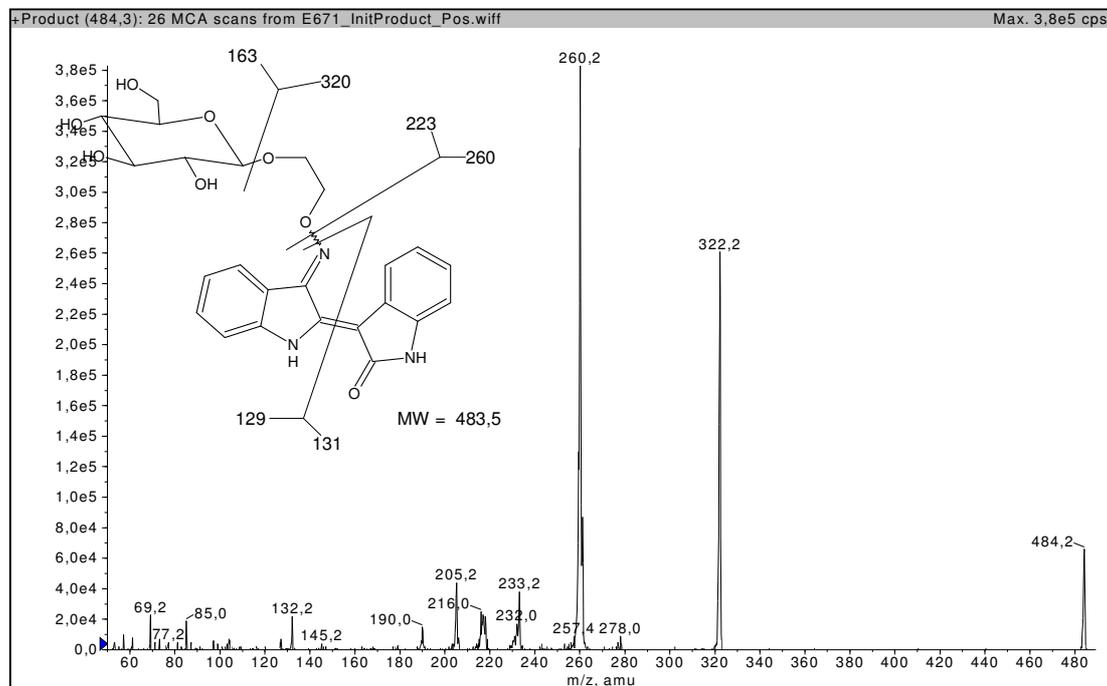


Abbildung 17: MS/MS von Indirubin-3'-(2-β-D-glucopyranosylethyl)oximether **15**

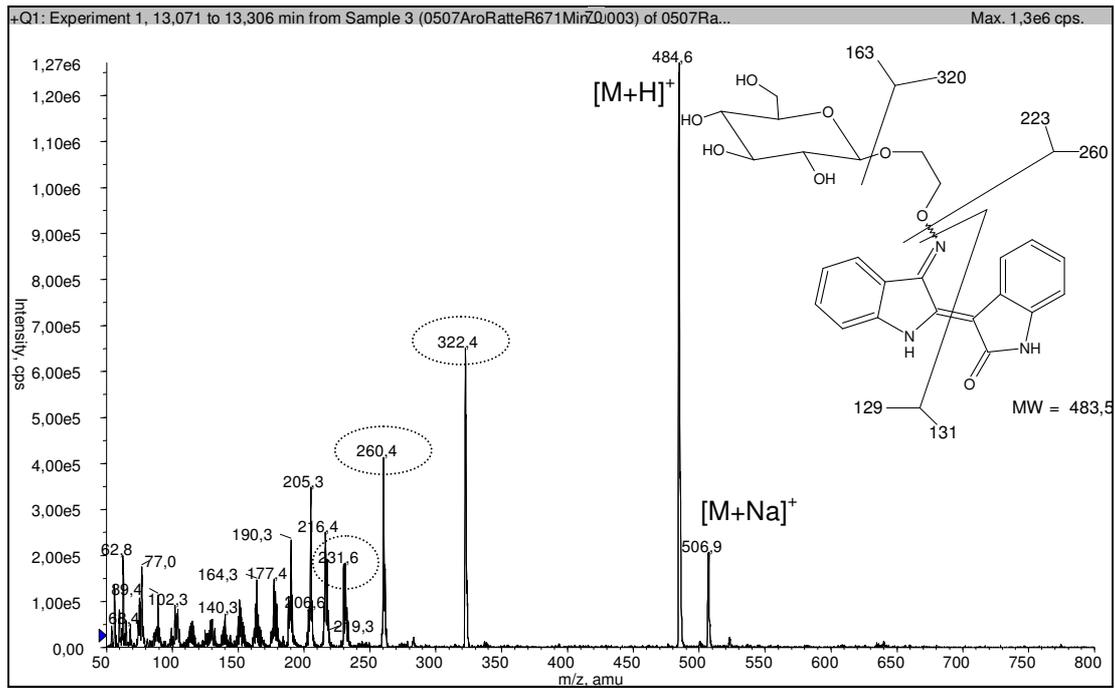


Abbildung 18: Inkubation von Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit **15**, Massenspektrum des UV-Peak M der 70 min. Inkubation

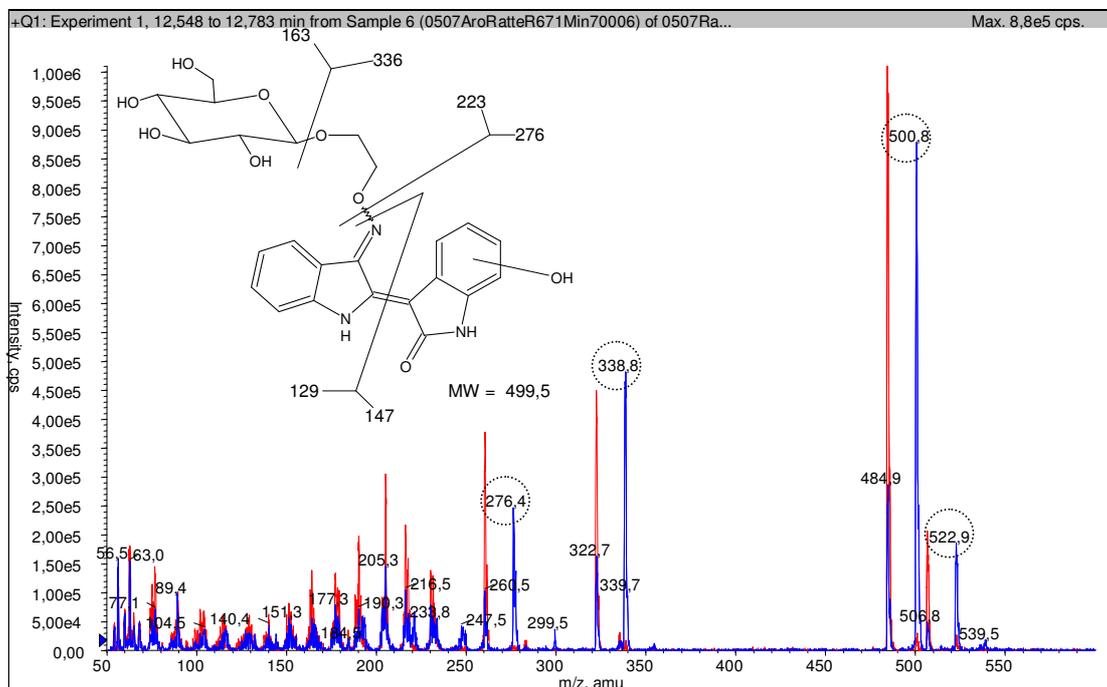


Abbildung 19: Inkubation von Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit **15**, Massenspektrum des M1 UV-Peak der 70 min. Inkubation überlagert mit Massenspektrum des M UV-Peak der 70 min. Inkubation

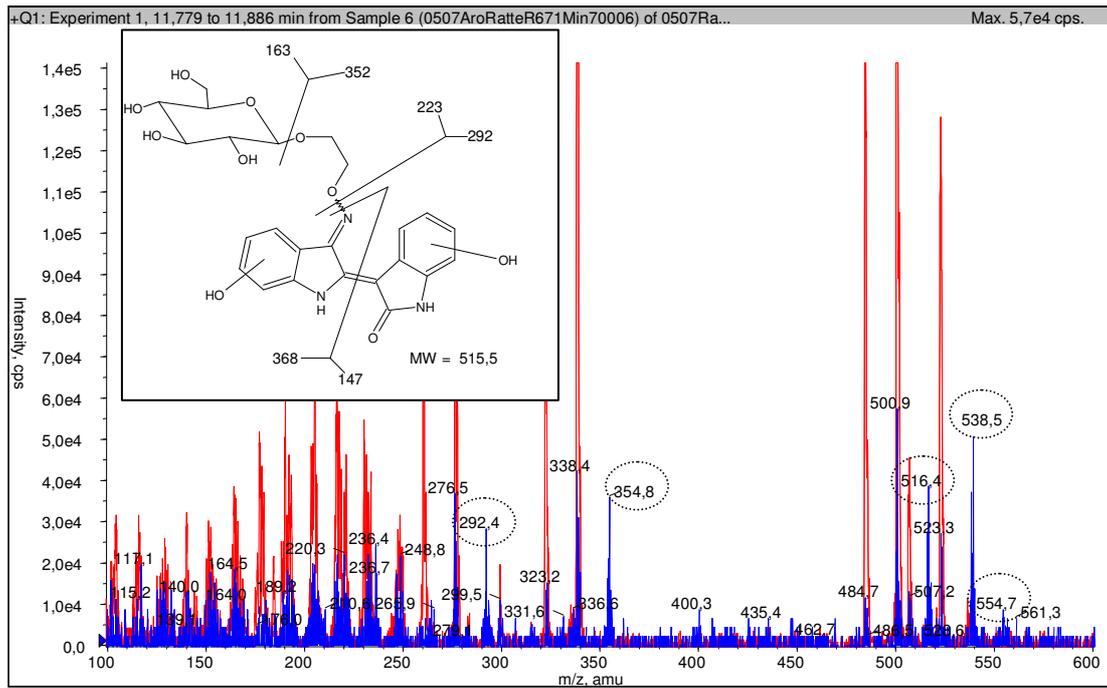


Abbildung 20: Inkubation von Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit **15**. Massenspektrum des M3 UV-Peak der 70 min. Inkubation überlagert mit Massenspektrum des M1 UV-Peak der 70 min. Inkubation

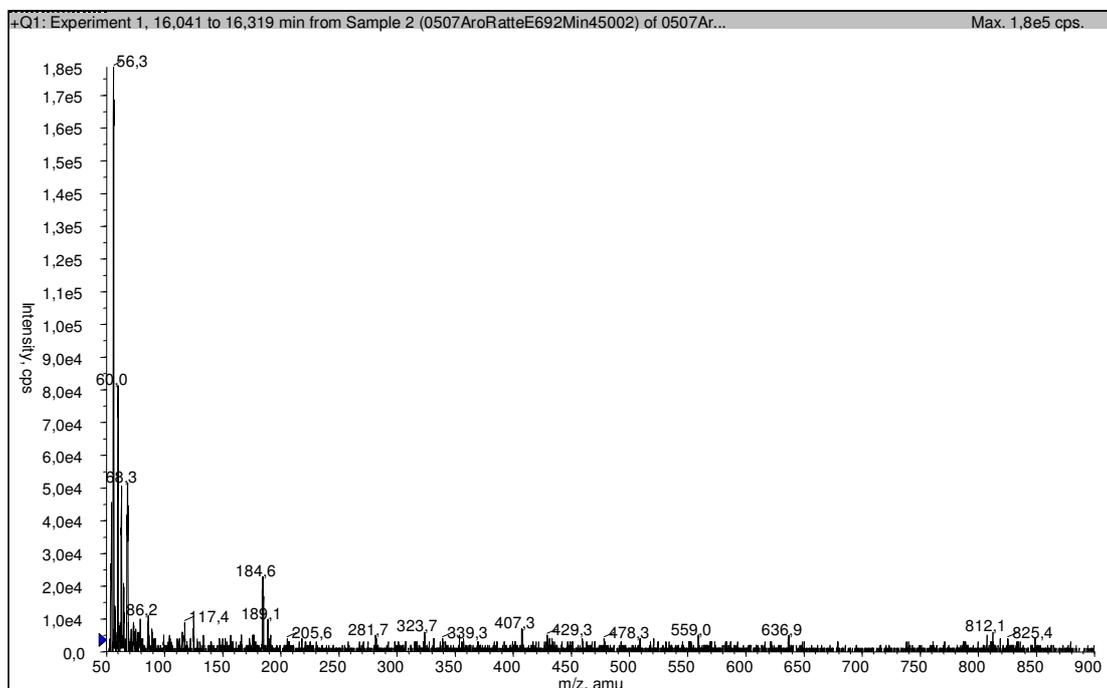


Abbildung 21: Inkubation von Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit **41**. Massenspektrum des UV-Peak X der 45 min. Inkubation

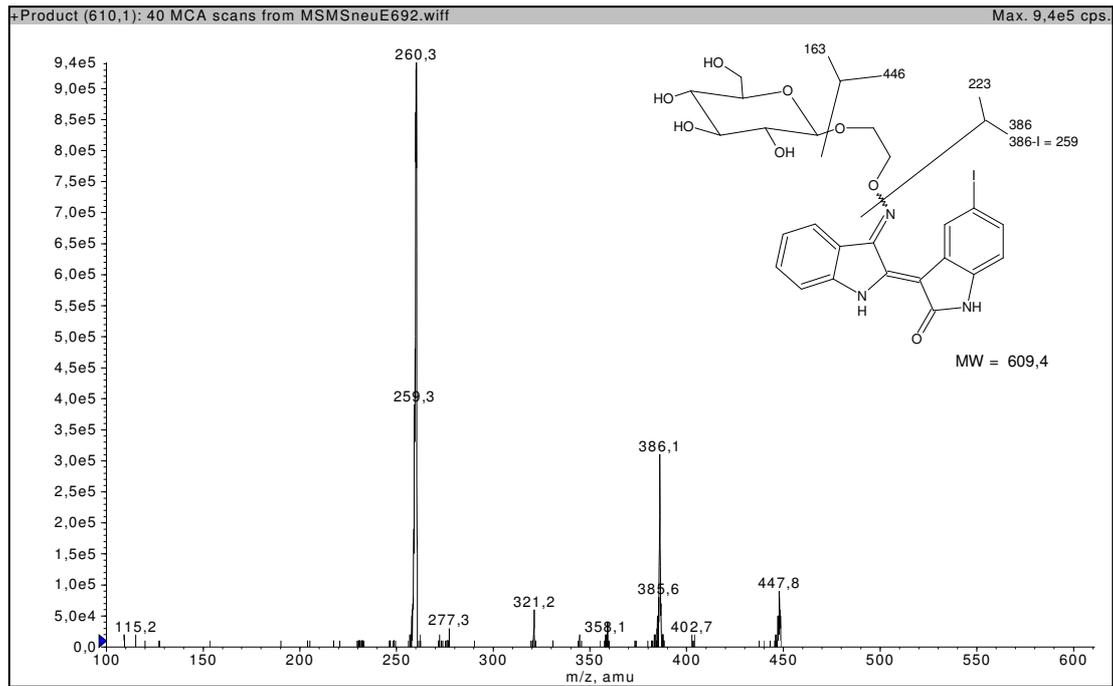


Abbildung 22: MS/MS von 5-Iodindirubin-3'-(2-β-D-glucopyranosylethyl)-oximether **41**

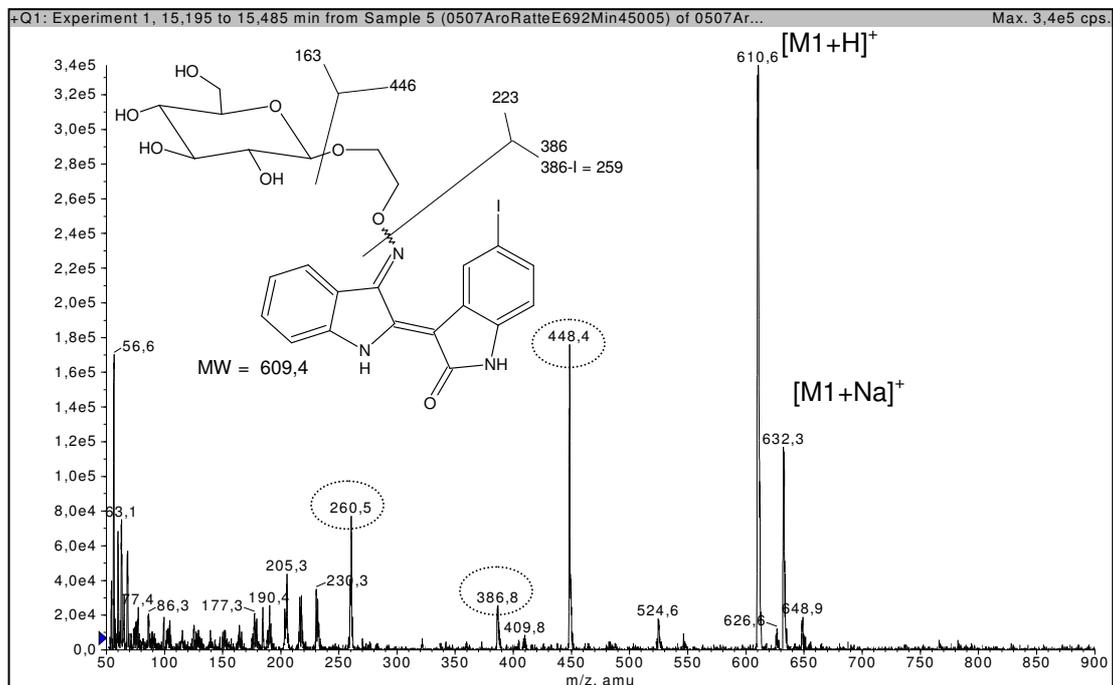


Abbildung 23: Inkubation von Arochlor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit **41**, Massenspektrum des UV-Peaks M der 45 min. Inkubation

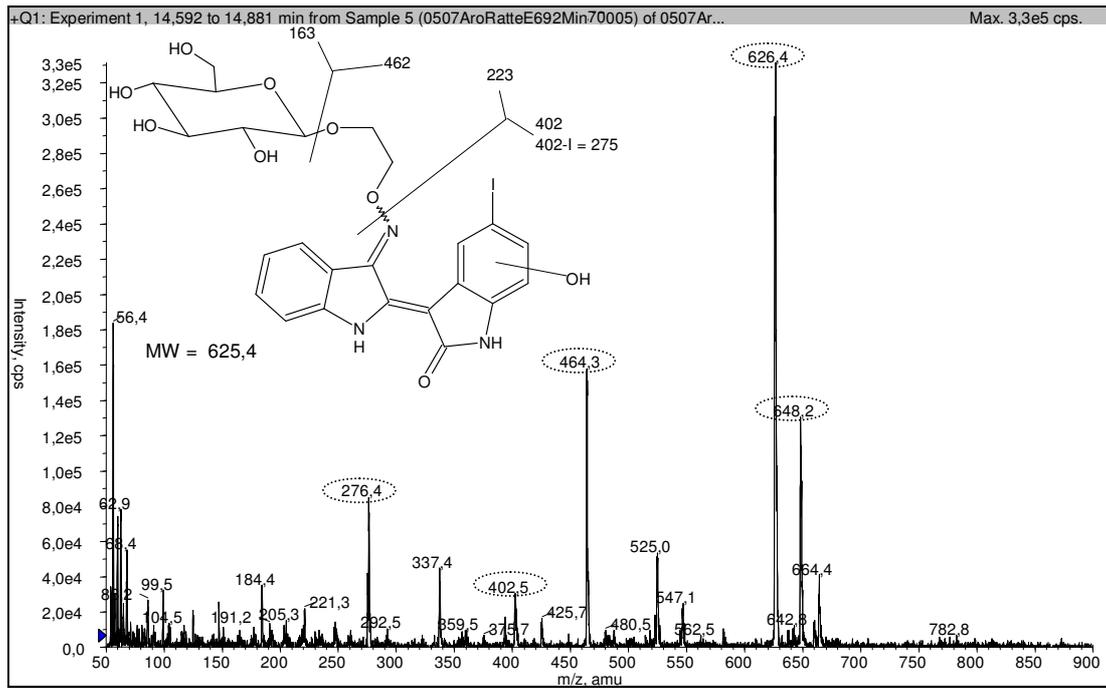


Abbildung 24: Inkubation von Arochlor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit **41**, Massenspektrum des M1 UV-Peak der 45 min. Inkubation

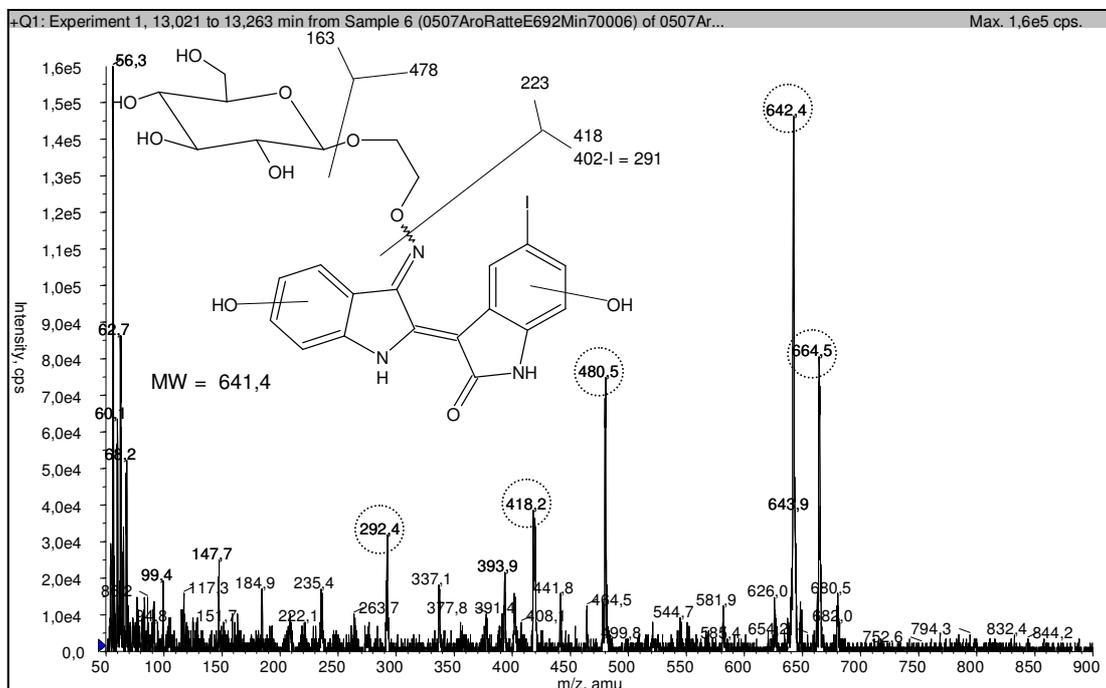


Abbildung 25: Inkubation von Arochlor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit **41**, Massenspektrum des M2 UV-Peaks der 45 min. Inkubation

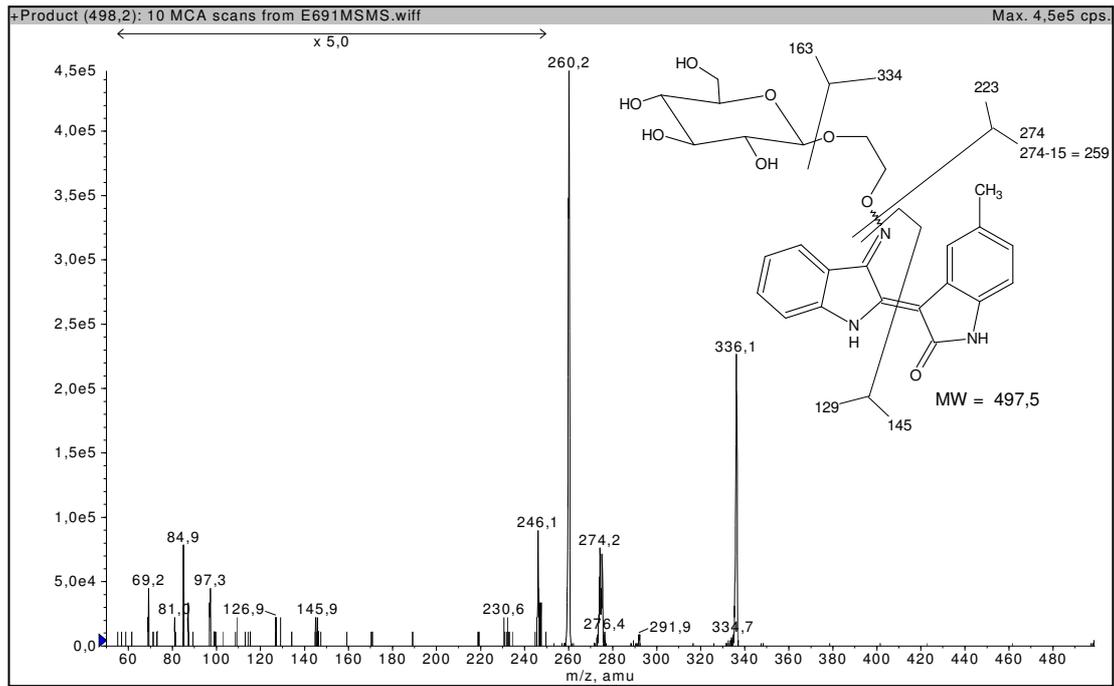


Abbildung 26: MS/MS von 5-Methylindirubin-3'-(2-β-D-glucopyranosyl-ethyl)oximether **16**

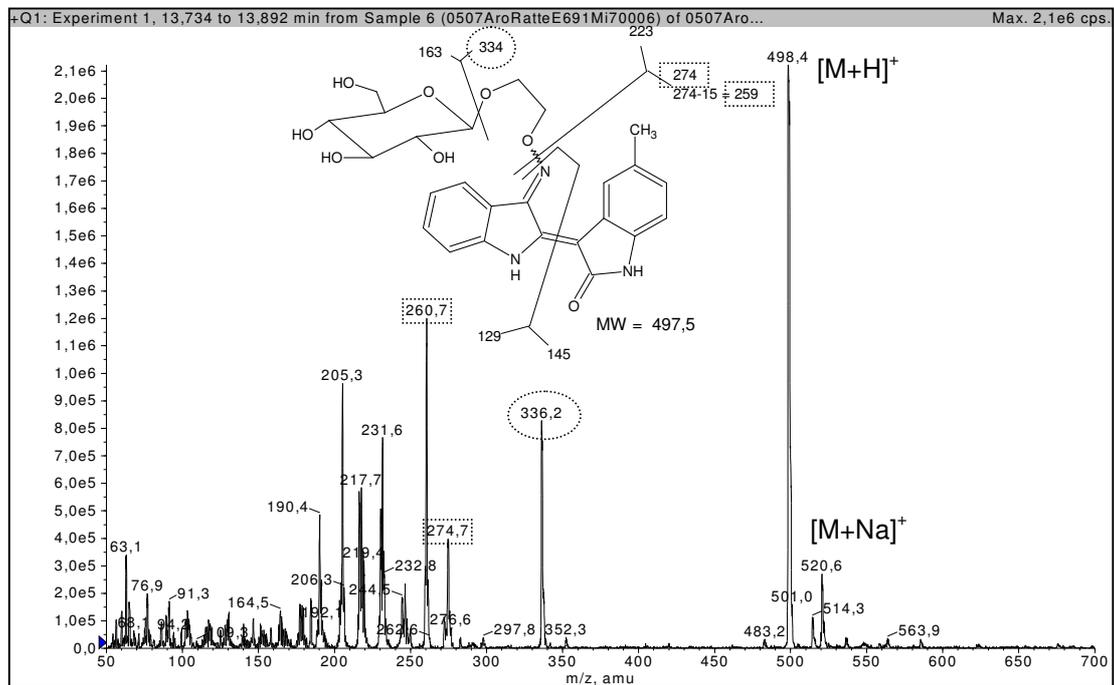


Abbildung 27: Inkubation von Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit **16**, Massenspektrum des UV-Peaks M der 70 min. Inkubation

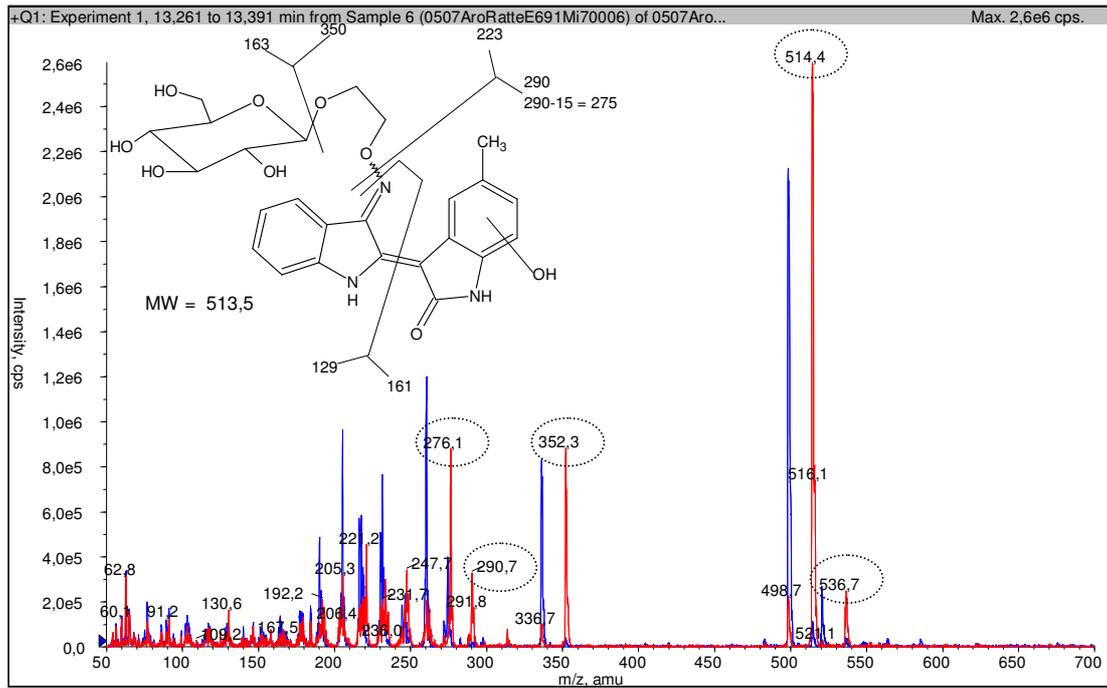


Abbildung 28: Inkubation von Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit **16**. Massenspektrum des M- UV-Peak der 70 min. Inkubation überlagert mit Massenspektrum des M1 UV-Peak der 70 min. Inkubation

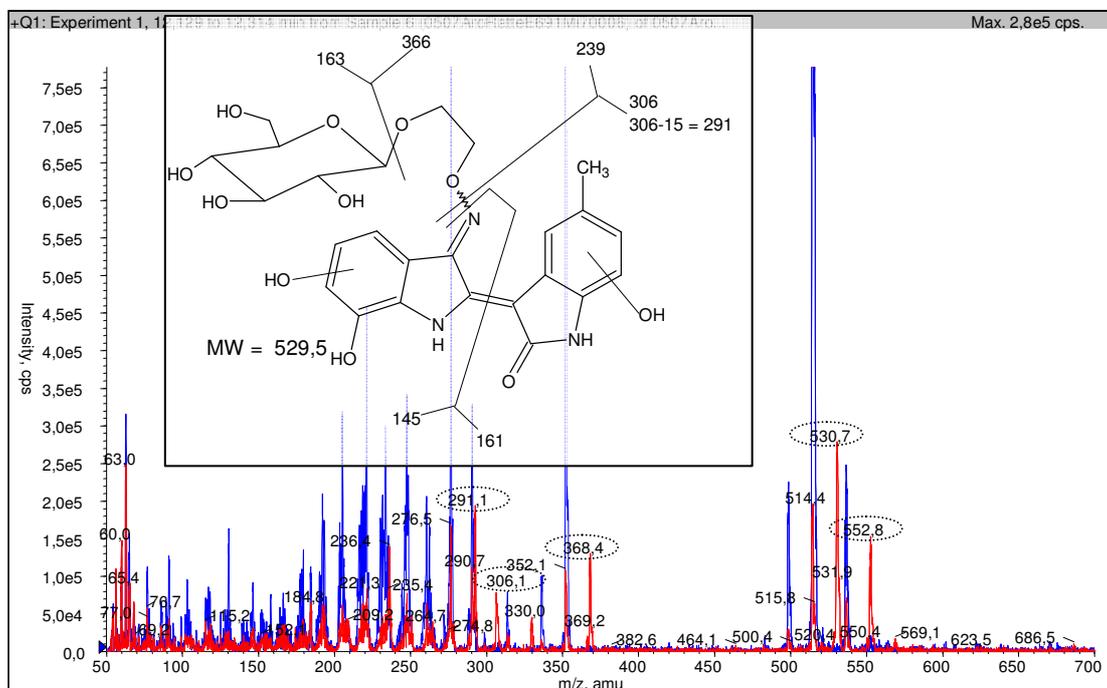


Abbildung 29: Inkubation von Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen mit **16**. Massenspektrum des M1 UV-Peak der 70 min. Inkubation überlagert mit Massenspektrum des M3 UV-Peak der 70 min. Inkubation

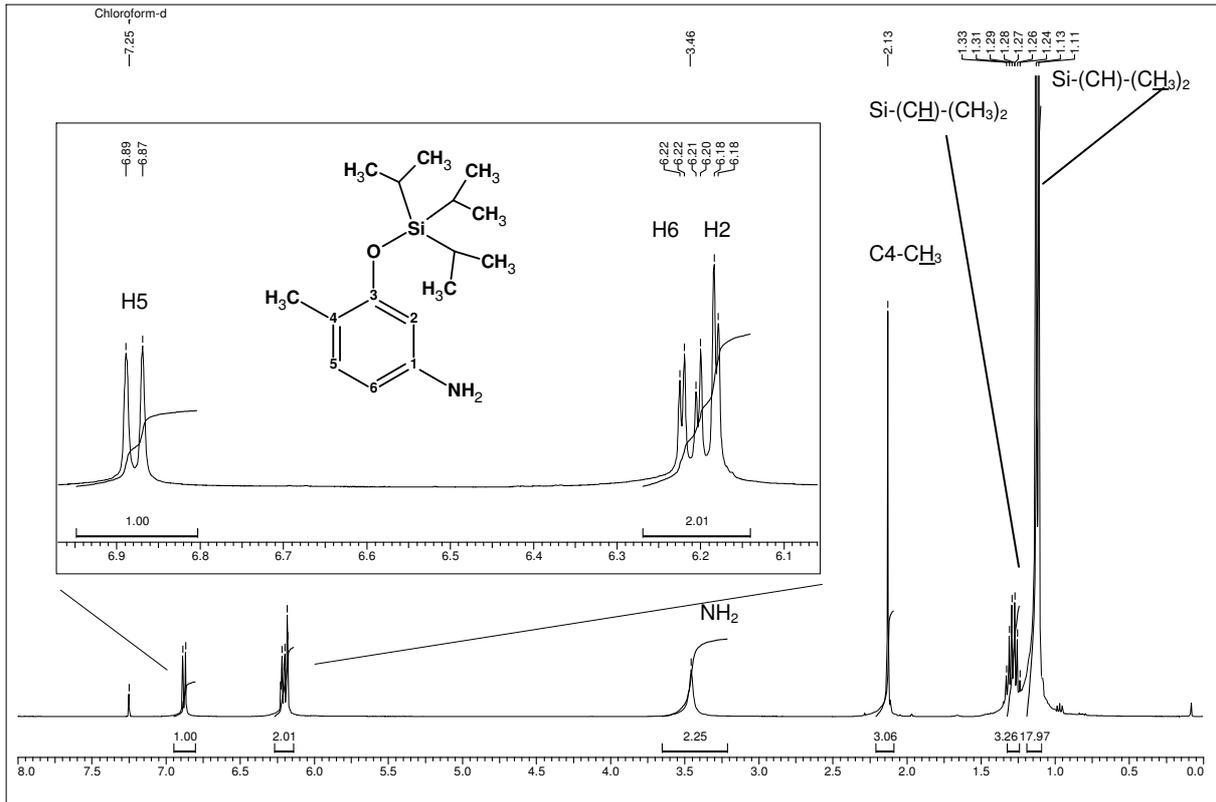


Abbildung 30: ¹H-NMR von 4-Methyl-3-(triisopropylsilyloxy)-anilin **79** (CDCl₃, δ = 7,25 ppm)

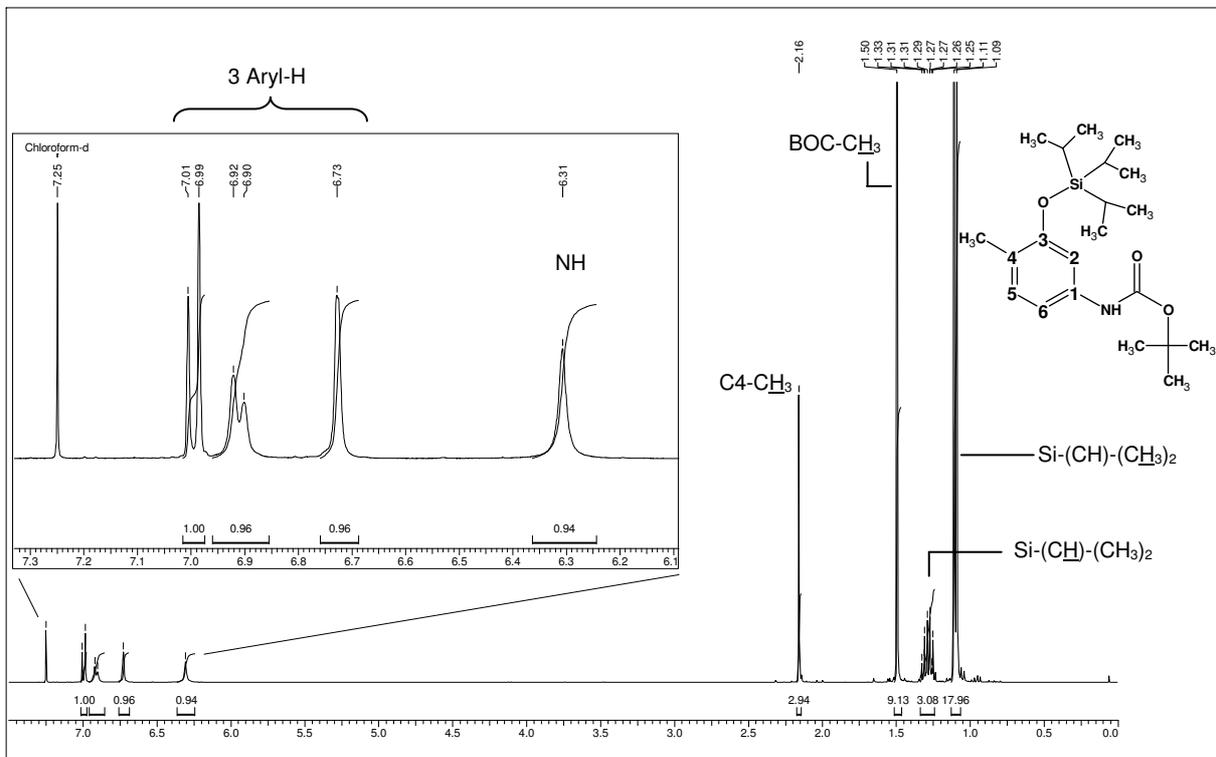


Abbildung 31: ¹H-NMR von tert-Butyl(4-methyl-3-(triisopropylsilyloxy)-phenyl)-carbamate **81** (CDCl₃, δ = 7,25, ppm)

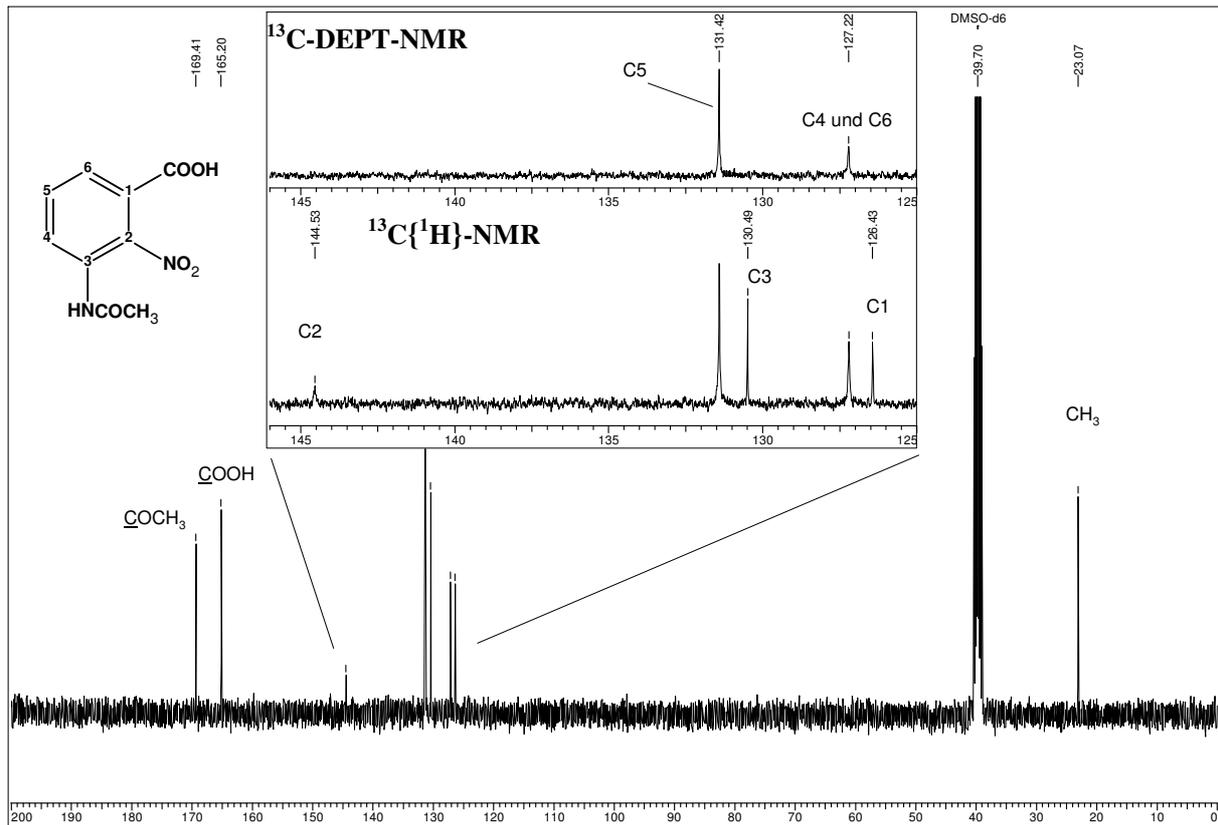


Abbildung 32: Vergleich des $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -Spektrum und ^{13}C -DEPT-Spektrum von 3-Acetamido-2-nitrobenzoesäure **96** (DMSO- d_6 , $\delta = 39,70$ ppm)

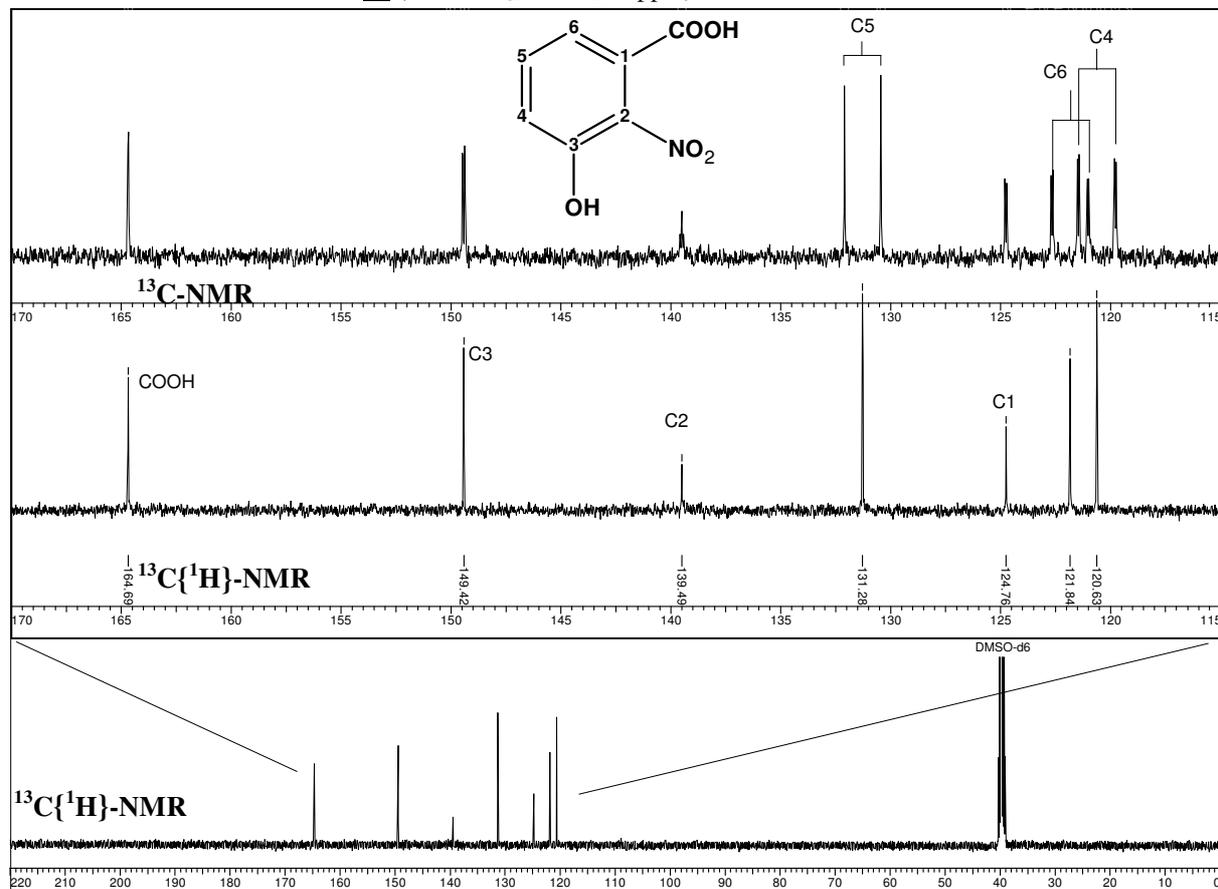


Abbildung 33: Vergleich des ^{13}C -, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -Spektrum und ^{13}C -DEPT-Spektrum von 3-Hydroxy-2-nitrobenzoesäure **97** (DMSO- d_6 , $\delta = 39,70$ ppm)

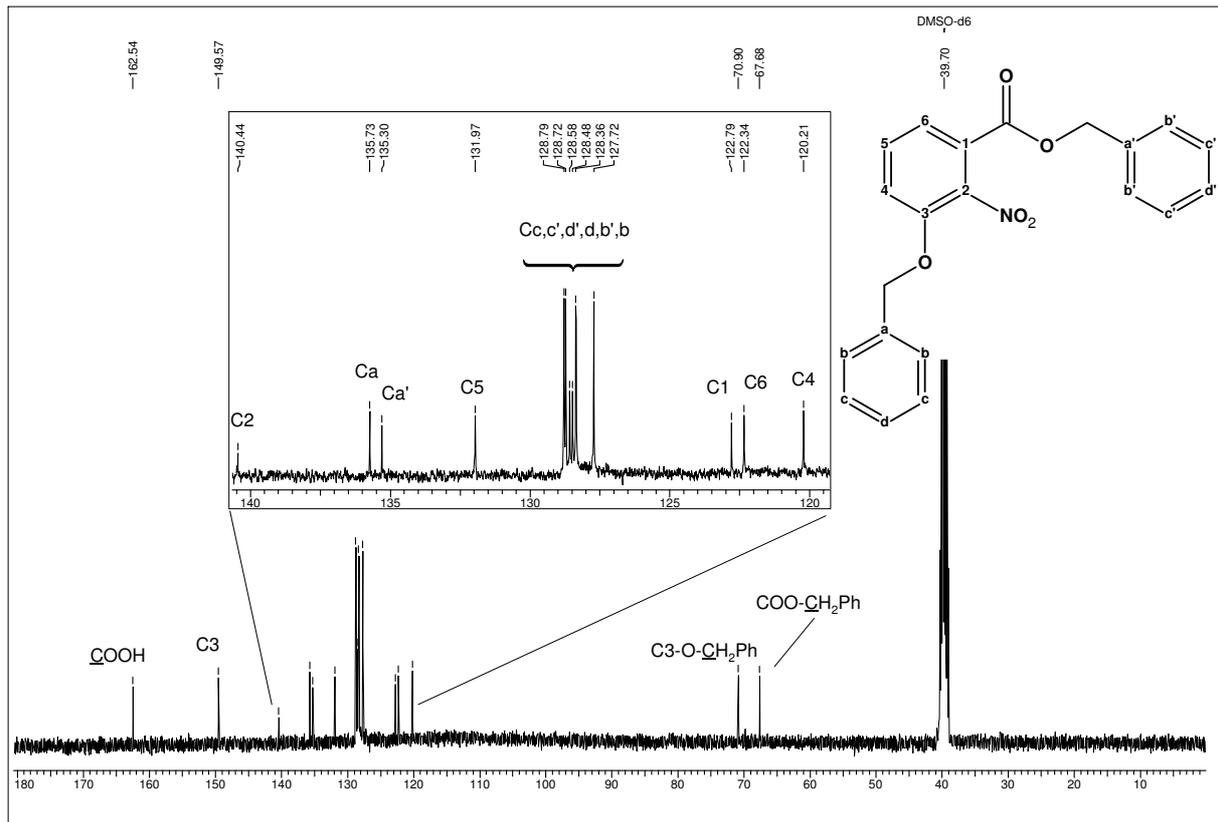


Abbildung 34: $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum von 3-Benzyloxy-2-nitro-benzoesäurebenzylester **98** (DMSO- d_6 , $\delta = 39,70$ ppm)

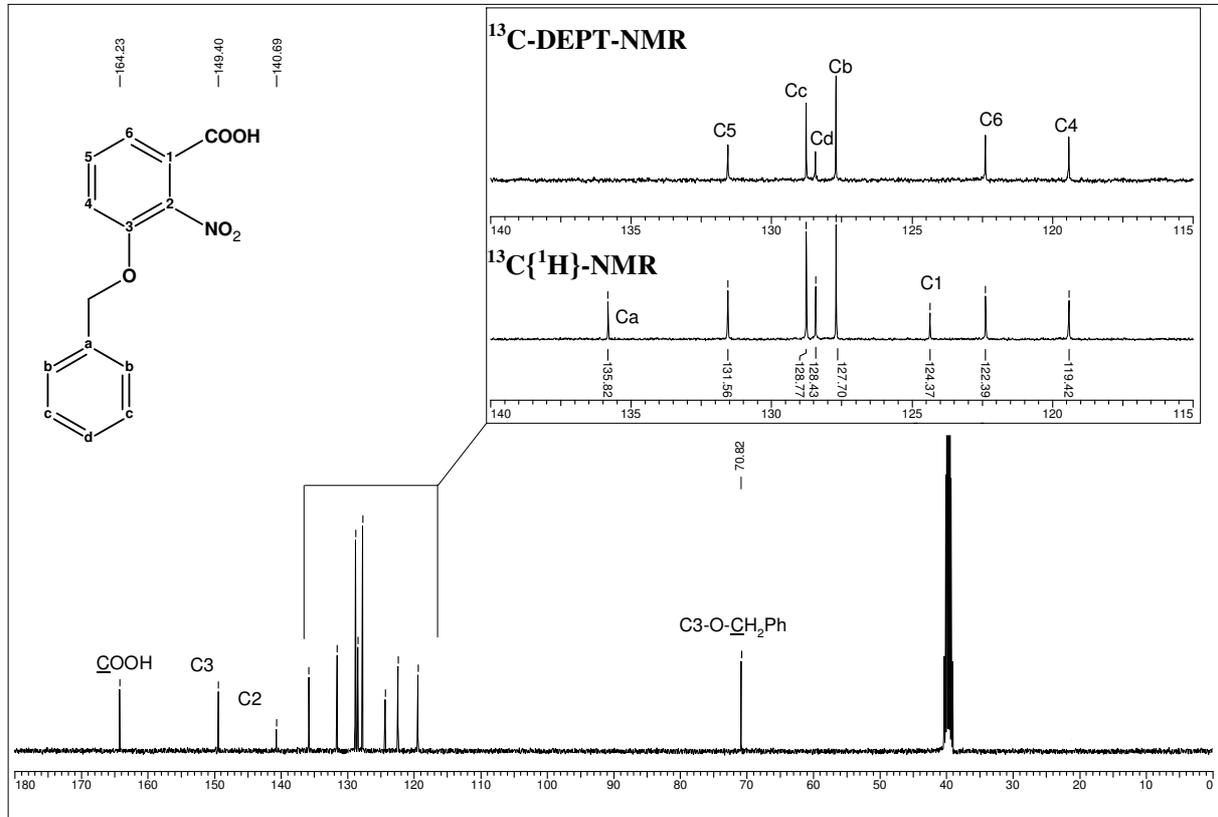


Abbildung 35: $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -Gesamtspektrum mit Teilbereichvergleich des $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ - und ^{13}C -DEPT-Spektrum von 3-Benzyloxy-2-nitro-benzoesäurebenzylester **99** (DMSO- d_6 , $\delta = 39,70$ ppm)

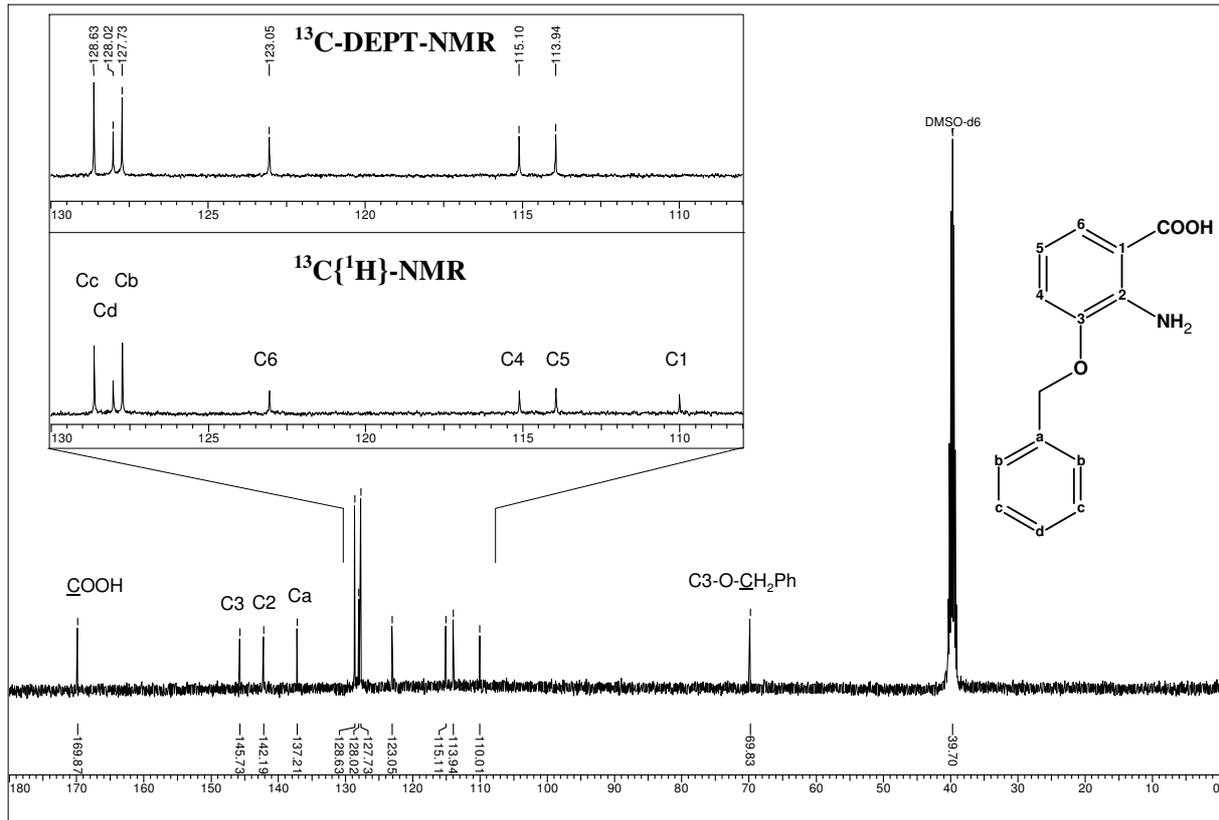


Abbildung 36: $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -Gesamtspektrum des 2-Amino-3-benzyloxy-benzoessäurebenzylesters **100** mit Teilbereichvergleich des $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ - und ^{13}C -DEPT-Spektrum (DMSO- d_6 , $\delta = 39,70$ ppm)

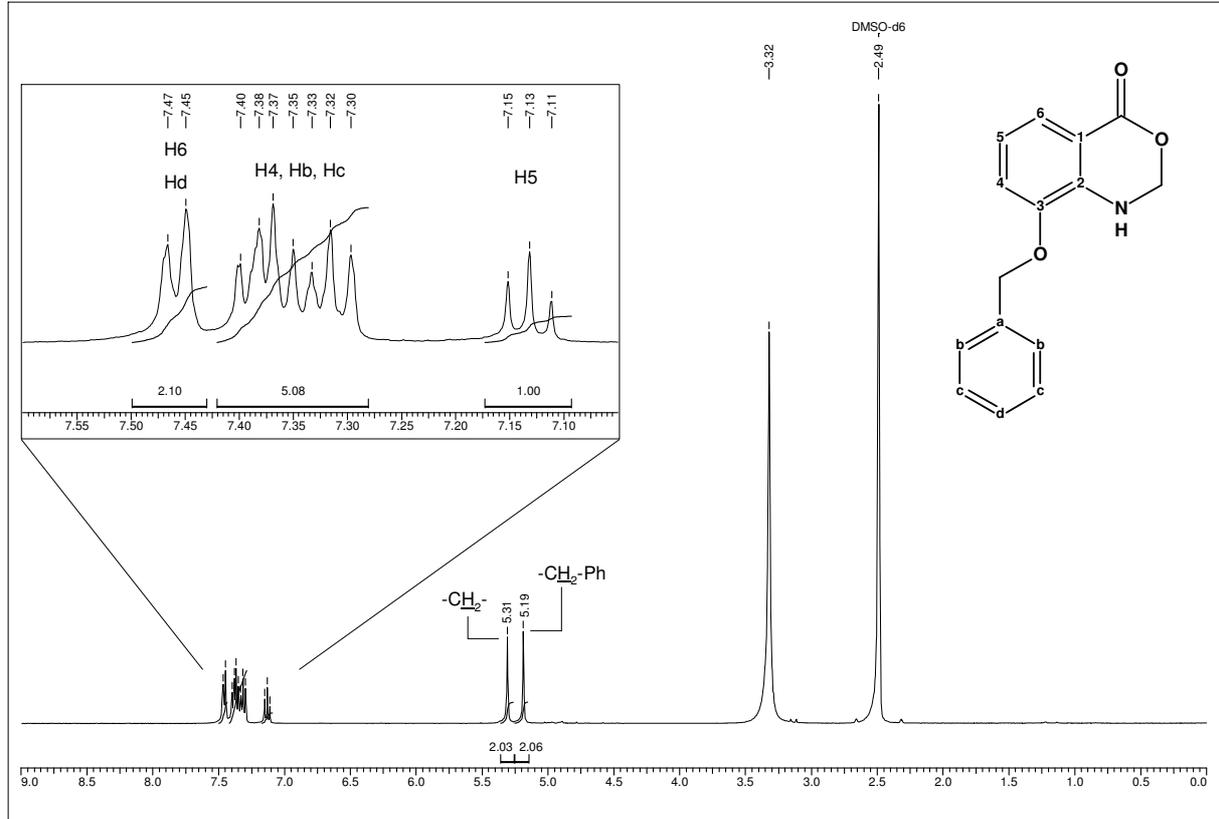


Abbildung 37: ^1H -NMR vom 3-Benzyloxy-anthranilsäure-formalid **101** (DMSO- d_6 , $\delta = 2,49$ ppm)

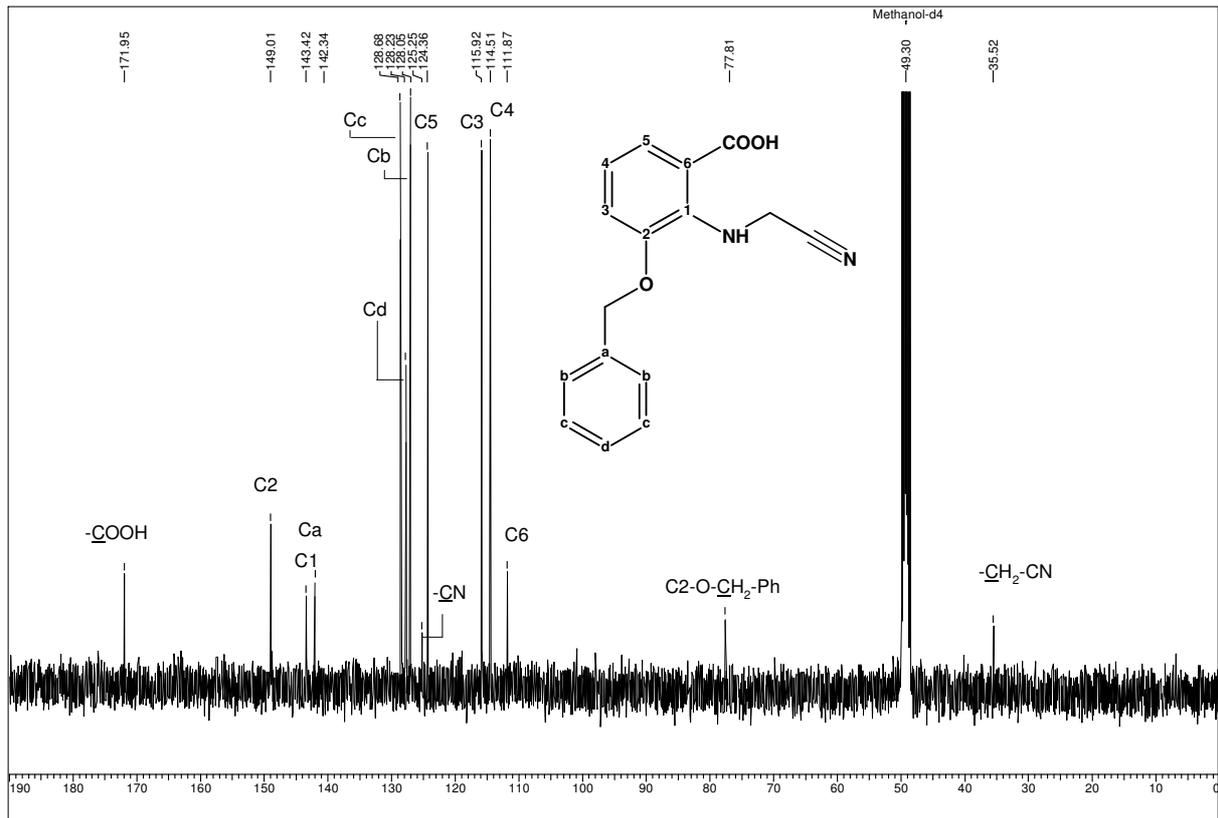


Abbildung 38: $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR vom *N*-(2-Benzyloxy-6-carboxyphenyl)-glycin-nitril **102** (MeOH- d_4 , $\delta = 49,30$ ppm)

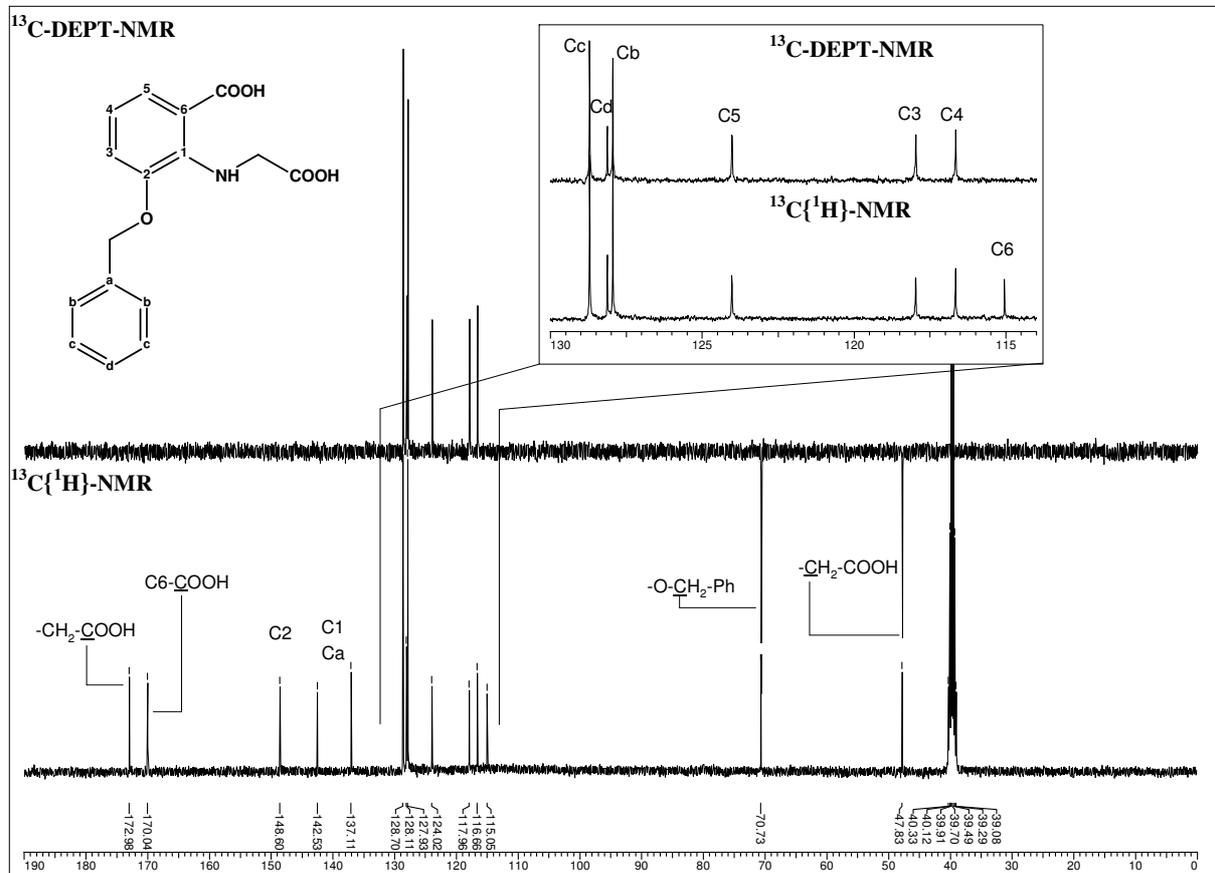


Abbildung 39: $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ - überlagert mit ^{13}C -DEPT-Gesamtspektrum des *N*-(2-Benzyloxy-6-carboxyphenyl)-glycin **103** mit Bereichsvergrößerung (DMSO- d_6 , $\delta = 39,70$ ppm)

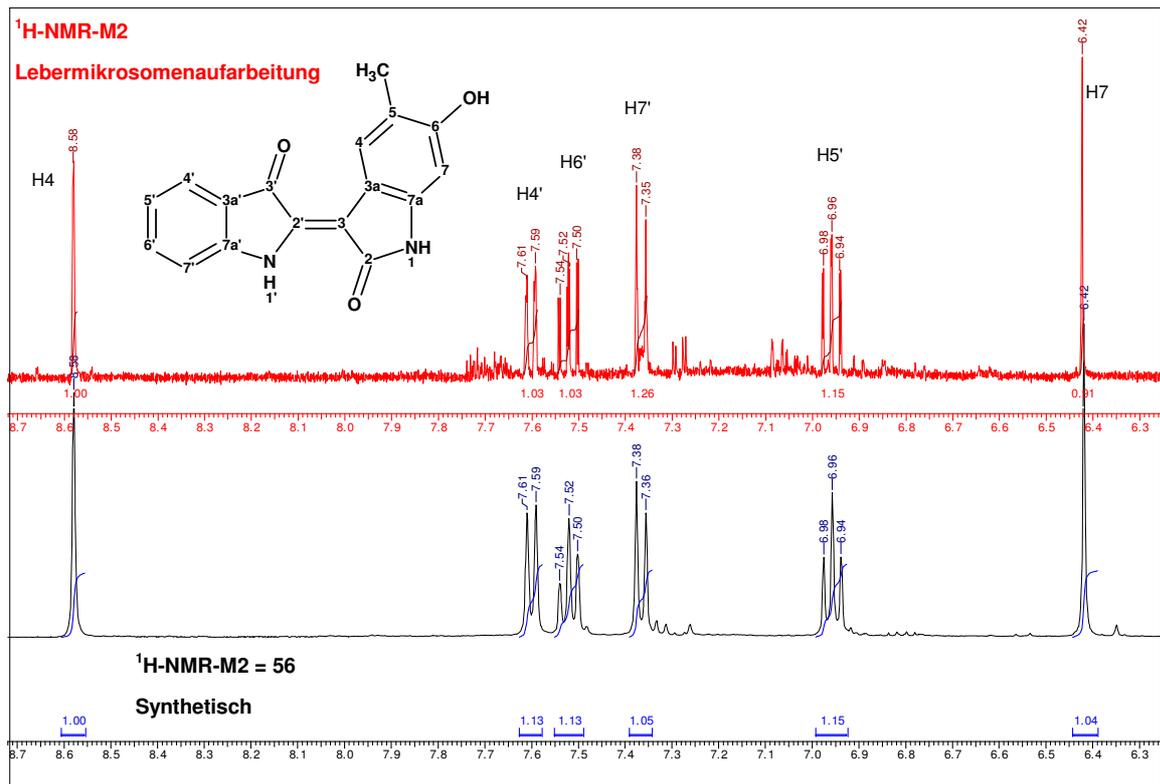


Abbildung 40: Überlagerte ¹H-NMR Spektren: Schwarz - Synthetisierte Verbindung **74**, rot – Isolierte Verbindung M2 aus der Inkubation von 5-Methylindirubin mit Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen.

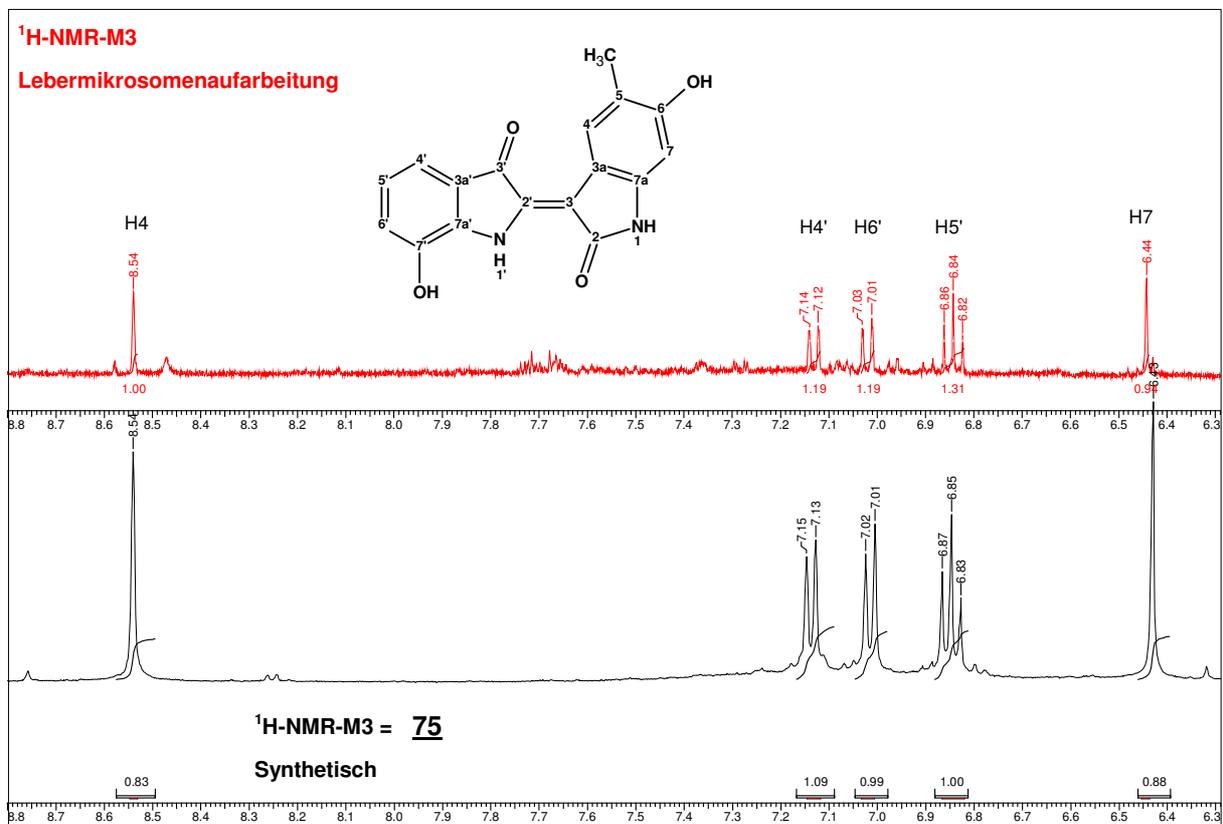


Abbildung 41: Überlagerte ¹H-NMR Spektren: Schwarz - Synthetisierte Verbindung **75**, rot – Isolierte Verbindung M3 aus der Inkubation von 5-Methylindirubin mit Aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen.

Dank

Mein Dank gilt allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern des Arbeitskreises Eisenbrand, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Dr. K.-H. Merz und Dr. M. Baum für die wissenschaftliche Unterstützung während meiner Promotion und für die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts.

Meinen Laborkollegen Dr. K.H. Merz, S. Mühlbeyer, Dr. S. Schwahn und Dr. A. Thommet für das angenehme Arbeitsklima im Labor und die Unterstützung in allen Lebenslagen.

Frau Dr. S. Vatter und Dr. S. Jakobs für die Durchführung der Zelltests.

Meinen Diplomanden S. Schmitt und L. Lüersen für ihre Mitarbeit an dieser Arbeit sowie M. Brulport für die Stunden an der MS.

Herrn Aribert Vetter und Herrn Rainer Scheuermann für ihre technische Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Frau H. Ruzek und Frau C. Dahler für die Aufnahme zahlreicher NMR-Spektren und ihre Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. S. Schwahn für sein Zuhören und Rat in allen Lebenslagen.

Herrn S. Mühlbeyer für die, teils verrückten, gemeinsamen Stunden im 5ten Stock.

Frau I. Hemm und Frau H. Syring für das gute Klima im Sekretariat.

Allen Freunden, die mich in guten und schlechten Zeiten unterstützt haben.

Meinen Eltern und meinem Bruder.

Und mein besonderer Dank an Anne und BO (Sam), für alles und immer...

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Frankie Hippe
Geburtsdatum: 13. September 1972
Geburtsort: Ettelbrück, Luxemburg
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

1978-1984 Ecole primaire de Diekirch (Luxemburg)
1984-1987 Lycée technique d'Ettelbruck (Luxemburg)
1987-1991 Lycée technique du Centre (Luxemburg)
Juni 1991 Diplôme de technicien en Chimie

Studium

1991-1994 Grundstudium der Chemie an der Universität
Kaiserslautern
August 1994 Vordiplom in Chemie
1994-1999 Hauptstudium der Chemie an der Universität
Kaiserslautern
April 1999 mündliche Diplomprüfung
Juni 1999 Beginn der Diplomarbeit an der Technischen Universität
Kaiserslautern unter Leitung von Herrn Prof. Dr. G.
Eisenbrand
März 2000 Diplom in Chemie
Juni 2000 Beginn der Doktorarbeit an der Technischen Universität
Kaiserslautern unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G.
Eisenbrand

Thema: Struktur und Wirkung von Metaboliten indigoider
Bisindole, neuartiger Hemmstoffe von Cyclin abhängigen
Kinasen