

学 位 論 文

Indirubin の生物学的親和性を利用した
ハイブリッド型抗腫瘍剤の創製

日本大学大学院薬学研究科 有機化学研究室

市丸 嘉

目次

| | |
|--|----|
| 序論..... | 1 |
| 本論..... | 6 |
| 第一章 Epoxy/Ind の開発とその細胞傷害活性の検証..... | 6 |
| 第一節 Epoxy/Ind の合成..... | 6 |
| 第二節 Epoxy/Ind の化学反応性の検討..... | 7 |
| 第三節 Epoxy/Ind の細胞傷害活性の検討..... | 9 |
| 第四節 細胞融解液を用いた Epoxy/Ind の代謝の検討および代謝物の細胞傷害活性の検討..... | 14 |
| 第五節 第一章のまとめ..... | 17 |
| 第二章 Epoxy/Br-Ind の開発とその細胞傷害活性の検証..... | 18 |
| 第一節 Epoxy/Br-Ind の合成..... | 18 |
| 第二節 Epoxy/Br-Ind の細胞傷害活性と代謝..... | 24 |
| 第三節 Epoxy/Br-Ind の不可逆的細胞傷害活性発現における時間および濃度依存性と代謝の検討..... | 28 |
| 結語..... | 31 |
| 謝辞..... | 35 |
| 実験の部..... | 36 |
| <i>Chemical synthesis</i> | 36 |
| <i>Bioassay</i> | 59 |
| 参考文献..... | 62 |

序論

近年、ライフスタイルの変遷とともに増加の一途をたどっている悪性新生物による疾患は、数十年にわたって日本人の主要な死因の一つであり続けている。腫瘍細胞は、細胞増殖誘導過程に生じた異常によって、正常な細胞よりも強力な細胞増殖能を有している^[1]。細胞増殖は、様々な mitogen によって惹起される数種類の階層的情報伝達経路で管理されており、情報伝達はリン酸化・脱リン酸化によるタンパク質機能の活性化/不活性化によって制御されている^[2]。このため、タンパク質リン酸化酵素 (protein kinase, 以下 kinase) は、細胞の増殖や腫瘍の悪性化と密接に関わっている。腫瘍細胞では、比較的簡単な遺伝子変異による kinase の恒常的な活性化や過剰発現が認められ、例えば receptor 型 tyrosine kinase である上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) は、腫瘍細胞内では機能が亢進しており、mitogen の 1 種である上皮成長因子 (EGF) が結合していない (通常は休止している) 状態でも、細胞増殖を誘導する kinase cascade を活性化している^[3]。Kinase cascade は細胞分裂のみならず、血管新生や chemical mediator の産生など細胞の増殖と維持に必要な因子の誘導に関与しているため^[2,4]、腫瘍細胞において顕著に活性が上昇する kinase を標的分子と位置付けた創薬が盛んに行われており、kinase の阻害を介して抗腫瘍作用をもたらす分子は分子標的薬に分類される。

Kinase は、ATP を補酵素としており、そのリン酸基を標的タンパク質に転移させる^[5]。Kinase の ATP-binding site では、ATP の adenine 部分が認識部位であり、ATP はアミノ酸残基との相互作用によって結合している^[6]。Kinase に対する分子標的薬は、ATP-binding site において ATP と拮抗してリン酸化機能を阻害するもので、adenine に類似した含窒素芳香環構造を有している^[7]。可逆的 EGFR 阻害剤の gefitinib (Iressa[®]) や、erlotinib (Tarceva[®]), lapatinib (Tykerb[®]) などは、いずれも ATP-binding site 結合活性のある 4-anilinoquinazoline 構造を有している^[8]。一方、側鎖の構造は共通部位が少なく、共通点としては比較的かさ高い分子が多いことくらいである (Fig. 1)。これは、ATP-binding site 内には比較的大きな空間があり、様々な原子団を導入する事が可能であることを示唆しているが、いずれの

阻害剤もそれぞれの側鎖が EGFR の ATP-binding site 中に存在する特定のアミノ酸残基に対する親和性を企図したものではない。すなわち、これら阻害剤は分子全体として ATP-binding site に対する高い親和性を示し、競合的な EGFR 阻害作用が発揮されていると考えられており^[9]、また共有結合を形成する官能基をもたないため EGFR 阻害作用は可逆的なものである。一方で、EGFR の ATP-binding site 中に存在する cysteine 残基と michael 付加型の共有結合体を形成することで、EGFR を不可逆的に阻害するとして注目されているのが afatinib (Giotrif[®]) である^[10] (Fig. 2)。Afatinib も 4-anilinoquinazoline 構造によって EGFR の ATP-binding site に親和性を持つ点は共通しているが、側鎖部分の α,β -不飽和カルボニル構造が cysteine の thiol 基から求核攻撃をうけることで afatinib と EGFR は共有結合を形成し、不可逆的な EGFR 阻害作用が発揮されることが示されている (PDB: 4G5J)^[11]。

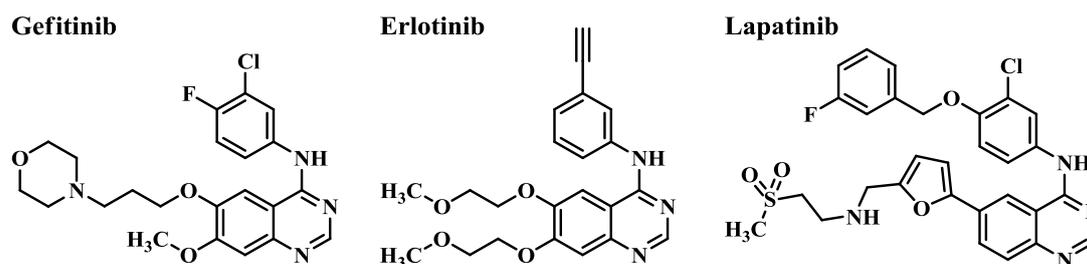


Fig. 1. 上市されている可逆的 EGFR 阻害剤の構造.

Afatinib のように標的生体分子に対する親和性部分と、生体分子の機能障害を担う活性部分の組み合わさった分子は、様々な生物活性分子に見出される組み合わせである。Aspergillus 属が産生する強力なカビ毒として知られる aflatoxin は、生体内で cytochrome P450 によって 8,9-*exo*-epoxide 型に代謝活性化されることで核酸塩基をアルキル化できるようになり、DNA に不可逆的な損傷を与えることが知られている^[12,13] (Fig. 3)。8,9-*Exo*-epoxide 型 aflatoxin においては、aflatoxin の環状平面構造が DNA 二重らせん構造への指向性を、epoxide 構造が活性発現に重要なアルキル化活性を担っている。本研究ではこれらの例に倣い、標的生体分子に親和性をもつ部分構造と、生体分子の機能を障害するための部分構造を組み合わせたハイブリッド型抗腫瘍剤 indirubin 3'-(*O*-oxiran-2-ylmethyl) oxime : Epox/Ind を設計した。

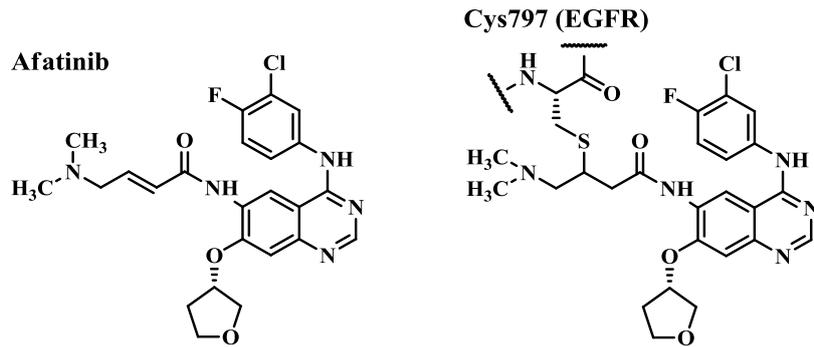


Fig. 2. 不可逆的 EGFR 阻害剤 afatinib の構造と結合様式。

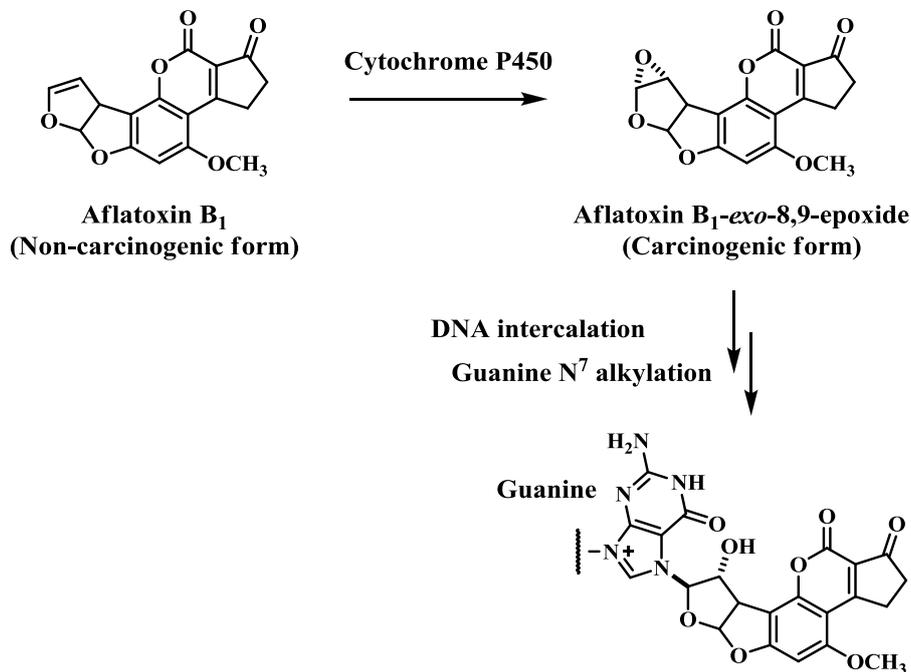


Fig. 3. Aflatoxin B₁ の毒性発現機序。

Indirubin (1) は、中医学において慢性骨髄性白血病に処方されてきた青黛の活性成分であり、cyclin-dependent kinase (CDK) の ATP-binding site に親和性を持つ bis-indole 化合物である^[14]。また indirubin は、CDK だけでなく glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) を強力に阻害することも知られており^[15]、主に CDK や GSK-3 β の阻害を介した抗腫瘍作用が期待されている。CDK や GSK-3 β は、いずれも EGFR 等の receptor 型 tyrosine kinase が起点となる kinase cascade の下流に位置する serine/threonine kinase で、これらの kinase 機能を阻害することによって抗腫瘍作用や神経変性の抑制など様々な生物活性が期待されている^[16,17]。CDK 阻

害による抗腫瘍作用において特に重要なのは、CDK と cyclin protein の複合体による細胞周期回転の直接的な制御機構である。特に G1 期の初期段階を活性化する CDK4/cyclin D および CDK6/cyclin D 複合体は、腫瘍細胞内では mitogen signaling によって cyclin D が過剰発現することで高度に活性化しており、細胞増殖を惹起している。そこで、CDK4/6 を標的とした創薬が盛んになってきており^[18]、米国食品医薬品局 (FDA) は 2015 年 2 月に palbociclib (Ibrance[®]) を乳がんを適用対象とする抗腫瘍剤として承認した。一方、GSK-3 β は、glycogen synthase を不活性化する kinase としてウサギの骨格筋で見出された酵素であるが、現在では様々な組織で発現していて、mitogen signaling を含む多様な情報伝達経路に関連していることが報告されているものの未解明な点も多く残されている^[17]。しかし、GSK-3 β 阻害剤には抗腫瘍作用があることが実験的に示されており、apoptosis 誘導や glucose 代謝異常を引き起こすことが抗腫瘍作用の機序であると考えられている^[19,20]。

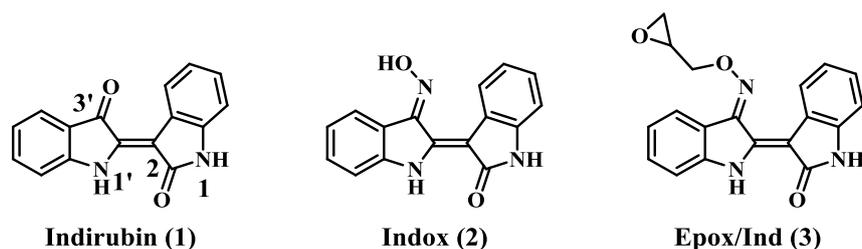


Fig. 4. Indirubin および indirubin 誘導体の構造.

Indirubin 骨格は、CDK や GSK-3 β の ATP-binding site に親和性を有することがわかっており、kinase と相互作用を形成するのは 1, 2, 1'-位であることがわかっている^[14]。実際に 1 位の窒素を methyl 化した indirubin 誘導体においては、kinase 阻害活性が大幅に損なわれることも報告されている^[21]。元来、indirubin は天然物由来成分として単離された化合物ではあるが、培養細胞を用いた検討において細胞傷害活性を示す濃度は非常に高く、これまでに indirubin の生物活性について検討してきた研究のほぼすべてが、3'位 carbonyl 基を oxime 基に変換した indirubin 3'-oxime (Indox, 2) を母化合物とする indirubin 誘導体に関するものである (Fig. 4)^[22-24]。本研究で設計した Epox/Ind (3) も Indox を母核として設計したもので、indirubin 骨格による CDK や GSK-3 β への親和性が期待される。また、

Indox の oxime 部位を足場として、epoxide 構造を含む oxiranylmethyl 基を導入し、ATP-binding site 内でのアミノ酸残基との共有結合形成を期待した。Epoxy/Ind には、indirubin 骨格に由来する kinase 指向性と、epoxide 基による不可逆的な酵素機能阻害による抗腫瘍作用が期待できる。

ここで indirubin の生物学的な側面を見てみる。Indirubin は健常人の尿中に見出される分子でもあり、dioxin receptor と呼ばれる aryl hydrocarbon receptor (AhR) の内因性 ligand とされている^[25]。AhR はほぼすべての細胞、組織で発現が認められ、ligand が結合することで、主に CYP1 や glutathione-S-transferase、UDP-glucuronosyltransferase の誘導に関与する他、kinase cascade への関与や、T-cell の分化に影響することで、細胞周期に関連することを示唆した報告もある^[26,27]。Indirubin の AhR に対する親和性は、dioxin 類の中で最も毒性が高い 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) の 50 倍とされているが^[25]、dioxin 類とは異なり indirubin の AhR を介した毒性に関する報告は未だにない。生体内に存在する indirubin に AhR を介した毒性の報告がないということは、新規抗腫瘍剤の開発において、indirubin 骨格を母核とするうえで有利な情報である。また、近年盛んに用いられるようになってきた tyrosine kinase 阻害型分子標的薬は、kinase cascade の上流を遮断することに由来する心血管毒性が問題視されるようになってきており^[28]、より直接的に細胞周期回転に関与する serine/threonine kinase の阻害剤が求められている点からも、indirubin は ATP-binding site 親和性基として優れている。

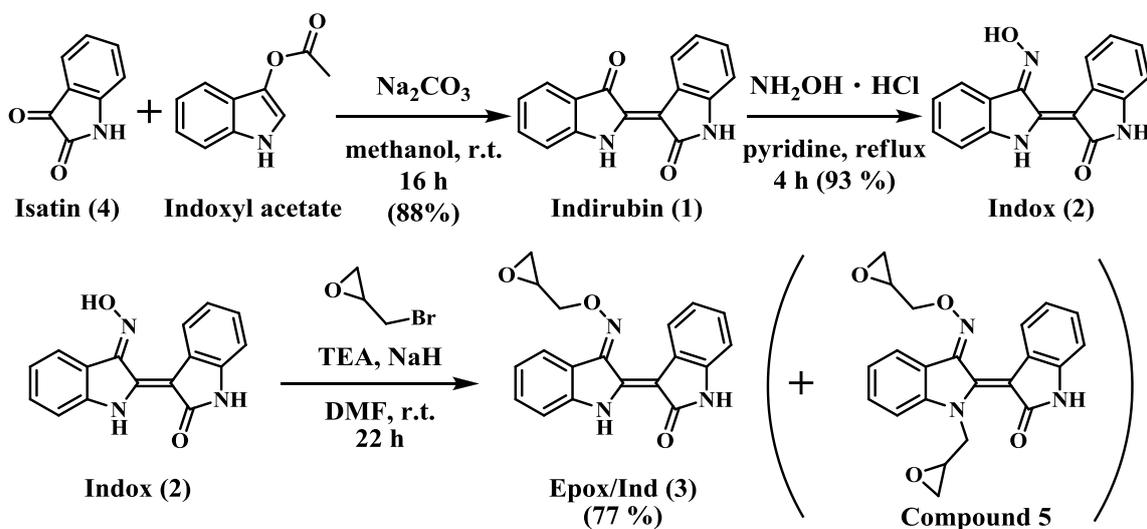
以上のような観点から、本研究では細胞周期回転を直接的に制御する serine/threonine kinase に対する indirubin の生物学的親和性を利用したハイブリッド型抗腫瘍剤 Epoxy/Ind と、芳香環上に置換基をもつ Epoxy/Ind 誘導体の創製について検討した。

本論

第一章 Epox/Ind の開発とその細胞傷害活性の検証

第一節 Epox/Ind の合成

はじめに、本研究で設計した Epox/Ind (3) の合成法について述べる。Epox/Ind は、後述するように indirubin 3'-oxime (Indox, 2) に epibromohydrin を作用させて調製する化合物である。Indox は市販もされているが非常に高価であり合成原料としての利用は困難であった。そこで、十分量の Epox/Ind を得るために、比較的安価な indole 誘導体を出発原料として、常法に従い Indox を調製した^[14]。すなわち、まず isatin (4) と indoxyl acetate の縮合により indirubin (1) を調製し、次いで indirubin に hydroxylammonium chloride を作用させて Indox へと導いた。Hydroxy 基の活性化剤として triethylamine (TEA) と sodium hydride (NaH) を用いて Indox を epibromohydrin との反応 (S_N2 反応) に付し、目的とした Epox/Ind を 77%の収率で得た (Scheme 1)。なお、oxirane (epoxide) は、高度に歪んだ環状構造であり、化学的安定性は比較的低く、酸性条件下では容易に加水分解を受けることが知られているが、本研究で合成に用いた塩基性条件下では比較的安定で、合成副産物は epibromohydrin が indirubin の 1' 位に付加した bis(oxiranylmethyl) 誘導体 (5) のみであった。



Scheme 1. Epox/Ind (3) の合成法。

第二節 Epox/Ind の化学反応性の検討

Epox/Ind は、kinase の ATP-binding site 中のアミノ酸残基のアルキル化、とりわけ thiol 基をもつ cysteine 残基との反応を企図した indirubin 誘導体である。Epox/Ind の想定標的タンパク質の 1 つである GSK-3 β の ATP-binding site 内には kinase 活性発現に必要不可欠な cysteine 残基 (Cys199) が存在しており^[29]、Indox 誘導体との結晶の X 線結晶解析において Indox の 3' 位 oxime 基の近傍に位置することが示されている^[30] (Fig. 5)。また同様に標的タンパク質候補である CDK においても活性型の CDK1/cyclin B 複合体の ATP-binding site 内に cysteine 残基 (Cys312) が存在している^[31]。そのような観点から、まず Epox/Ind の thiol 基に対する化学的反応性を検討することとした。

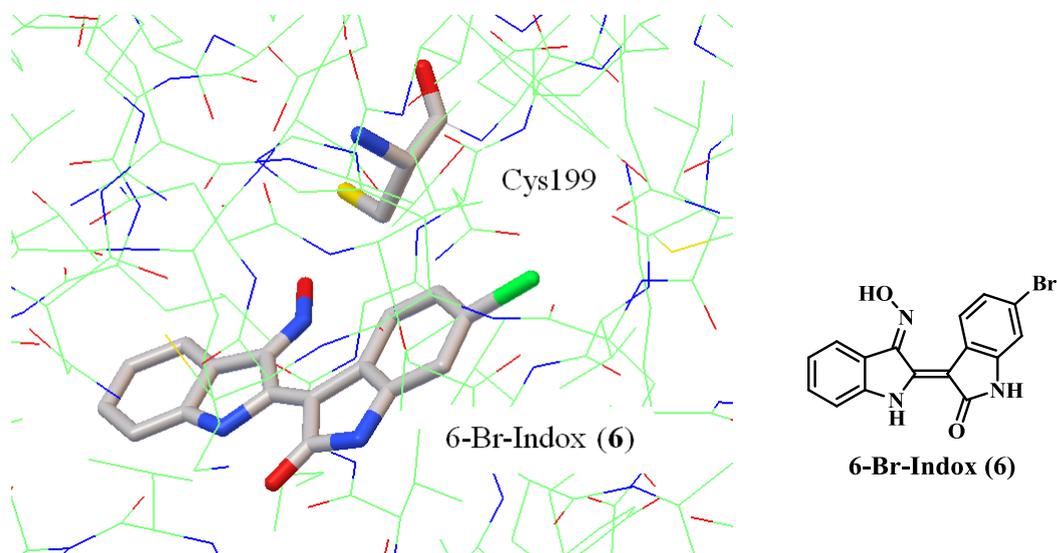
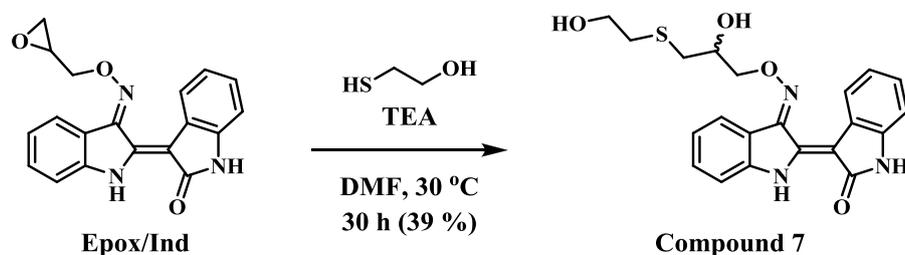


Fig. 5. 6-Br-Indox (6) を ligand とする GSK-3 β の結晶構造 (PDB:1UV5^[30] were created with Python Molecular Viewer).

反応の検討には、モデル thiol 化合物として 2-mercaptoethanol (2-ME) を用いることとし、反応温度は生体内環境を超えない 30 °C とした。また、第一節の合成の際に oxirane を不安定化することは無いと判断した TEA を thiol 基の活性化試薬として用いた。ただし、Epox/Ind は水のみならず alcohol 類に対する溶解性も低いことから、溶媒は *N,N*-dimethylformamide (DMF) とした。このような反応条件において生成した付加体を単離し、構造決定を行ったところ、Epox/Ind の oxirane 部分の立体障害が少ない methylene 基側に 2-ME の thiol 基部分が反応し

た indirubin 3'-(O-2-hydroxy-3-(2-hydroxyethylthio)propyl)oxime (7) であることが明らかになった (Scheme 2)。なお、この構造は本付加体を pyridine 中で無水酢酸を作用させて得られた diacetate 体における $^1\text{H-NMR}$ の chemical shift の変化においても支持されるものである (Fig. 6)。



Scheme 2. 生体内環境に見立てた条件下での Epox/Ind と 2-ME の反応.

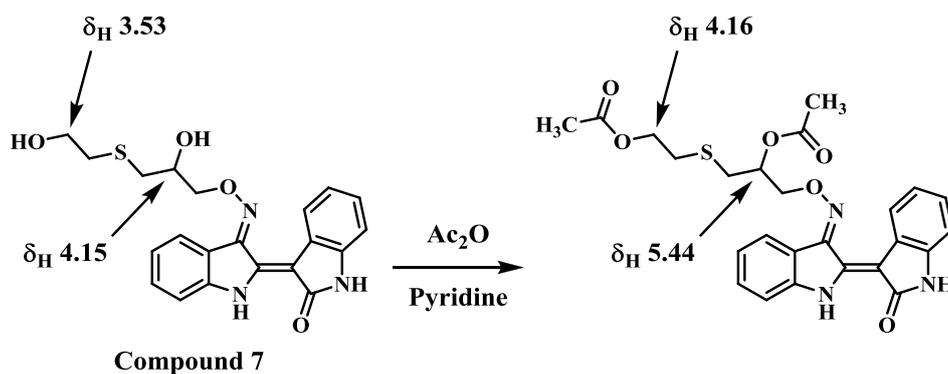


Fig. 6. Compound 7 の diacetate 体における $^1\text{H-NMR}$ の chemical shift の変化.

第三節 Epox/Ind の細胞傷害活性の検討

Epox/Ind の細胞傷害活性は、ヒト肝がん由来の HepG2 細胞を用いて検討した。また、培養細胞の生存率は alamarBlue[®] assay により求めた。AlamarBlue[®] 試薬は、非蛍光性色素の resazurin を含む水溶液で、mitochondria の呼吸鎖に存在する酸化還元酵素により還元されると、発蛍光性の resorufin に変換される。死細胞では mitochondria の呼吸鎖の機能が失われているので、resorufin の生成は生細胞に由来することになる。したがって、被験物質非添加時の resorufin 量と添加時の resorufin 量の比較により生細胞の割合を算出できるとするものである。なお細胞生存率の評価に、不溶性の formazan の生成を指標とする MTT 法が繁用されているが、吸光度法における formazan の吸収波長が indirubin のそれと重なるため、測定値の確度が低くなる。その様な観点から、蛍光強度を測定する alamarBlue[®] assay は indirubin 誘導体の細胞傷害性評価に適した方法論である。

細胞傷害活性の検討に用いられる培養時間は、播布した細胞の doubling time の半分以下が一応の目安となっており、24 時間が一般的である。ATP-binding site 内での共有結合形成が想定作用機序である Epox/Ind では、競合阻害のみを作用機序とする Indox に比べて作用の長期持続化が期待できるが、文献資料等との比較検討のしやすさを考慮して、細胞傷害性の初期検討の培養時間は一般的な 24 時間とした。Fig. 7 に Indox と Epox/Ind の細胞傷害活性の検討結果を示した。縦軸は非添加時の蛍光強度を 100%とした相対的生細胞率を、横軸は添加試薬の終濃度 (対数值) を示す。この結果を基に 50%生育阻害濃度 (IC₅₀ 値) を算出したところ、Indox では 15 μM であったのに対して Epox/Ind では 1.7 μM であり、Epox/Ind において著しく小さな IC₅₀ 値が観察された。なお本培養条件では、indirubin は 30 μM まで細胞傷害活性を示さなかった (data not shown)。次いで、oxiranylmethyl 基の導入で観察された細胞傷害活性の上昇が、単に oxirane 構造の非選択的細胞毒性にのみ由来する可能性を検討することとした。そこで、Indox の部分構造に類似した isatin 3-oxime (8) から誘導した isatin 3-(O-oxiranylmethyl) oxime (Epox/Isatin, 9) を用い HepG2 細胞に対する細胞傷害活性を評価したところ、Epox/Isatin の IC₅₀ 値は 100 μM 以上であった (data not shown)。この結果、本

研究で観察した細胞傷害活性は、Epoxy/Ind 分子に備わった本質的なものであることが明らかになり、Indox に epoxide 構造を導入することにより細胞傷害活性の大幅な向上がもたらされ、その IC₅₀ 値は約 10 分の 1 にまで低下することが判明した (Fig. 8)。本研究で得られた知見は、Indox の様な高い標的タンパク質選択性と epoxide 構造の様な共有結合形成能の融合 (hybrid) が新たな分子標的薬の開発における有望な方法論であることを示唆している。なお、Epoxy/Ind の細胞傷害活性は、強力な抗腫瘍作用を有する *cis*-platin (HepG2 細胞に対する IC₅₀ 値は 4.0 μM^[32]) と同等以上の非常に強力なものである。

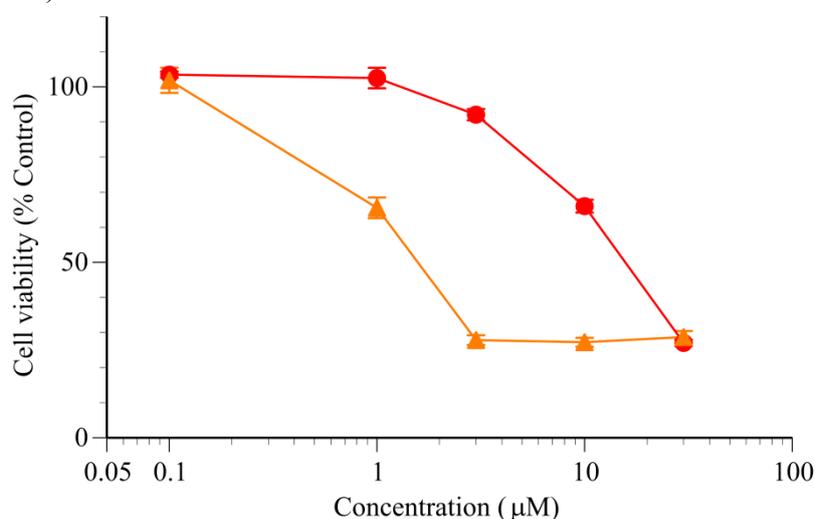


Fig. 7. HepG2 細胞に対する Indox (●) および Epoxy/Ind (▲) の細胞傷害活性。

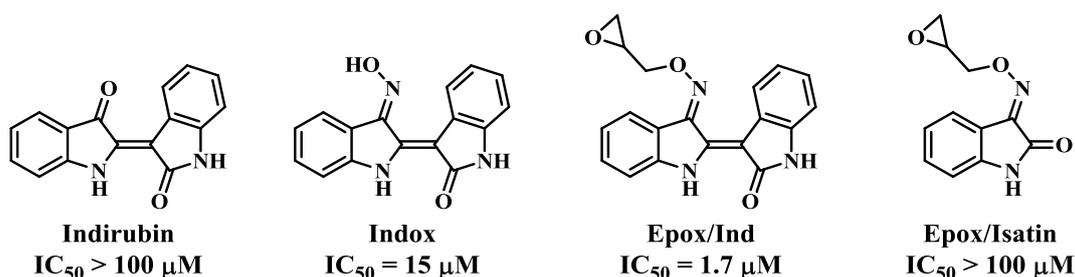


Fig. 8. Indirubin 誘導体および Epoxy/Isatin の IC₅₀ 値 (μM).

前述の如く、Epoxy/Ind は Indox に比べて作用時間の長期持続性が期待できる。そのような観点から、培養時間を長くして Epoxy/Ind の細胞傷害活性を再評価した。本培養条件における細胞の増殖速度を一定と仮定すると、Epoxy/Ind の作用

時間が短時間で、その限られた時間内に誘発された細胞死により生細胞数が減少した場合、一回程度の細胞増殖では生細胞数割合に差異は生じないと考えられる。一方、我々が想定したように Epox/Ind の作用時間は比較的長く、かつ共有結合形成にある程度の時間を要すると考えると、十分濃度以上の Epox/Ind が存在する培養条件では、培養時間が長くなるにつれてその見掛けの細胞傷害活性は高くなると考えられる。一般に HepG2 細胞の doubling time は約 48 時間であることから^[32]、doubling time を挟んでさらに 24 時間培養を続けることとし、培養時間を 72 時間とした。Fig. 9 に検討結果を示した。縦軸は alamarBlue[®] assay で測定した蛍光強度 (相対値) であり、生細胞数の指標とした。横軸は、添加した Epox/Ind の終濃度であり、対数で表示した。Epox/Ind 非添加時の蛍光強度は、培養時間 24 時間では約 9,000 であり、72 時間ではそれが 18,000 弱となり、72 時間培養により細胞数が二倍化したことが蛍光強度からも確認され、本培養条件下では培養時間を 24 時間から 72 時間に延長しても細胞増殖速度への影響はほとんど認められないこと、また蛍光強度の比較により細胞傷害活性の比較が可能であることを示している。Epox/Ind の添加実験では、添加濃度が 1 μM の時、24 時間培養時の蛍光強度は約 7,000 を示し、細胞生存率に換算すると約 75% 程度であったものが、72 時間培養時では蛍光強度は約 18,000 を示し、細胞生存率に換算すると 100% になったことから、添加濃度 1 μM 以下では 72 時間培養時には Epox/Ind の添加による細胞傷害効果が認められなくなることが明らかになった。一方、添加濃度 2 μM では、24 時間培養時の蛍光強度は約 4,000 を示し、細胞生存率換算で約 40% であったものが、72 時間培養時のそれらは約 12,000 および約 70% と、同濃度の Epox/Ind を添加しても異なる評価結果となった。さらに Epox/Ind の濃度を高め 3 μM とすると、24 時間培養時の蛍光強度は約 2,500 を示し、細胞生存率は約 30% であったものが、72 時間培養時のそれらは約 1,500 および 10% 以下と見掛け上の細胞傷害活性は向上した。

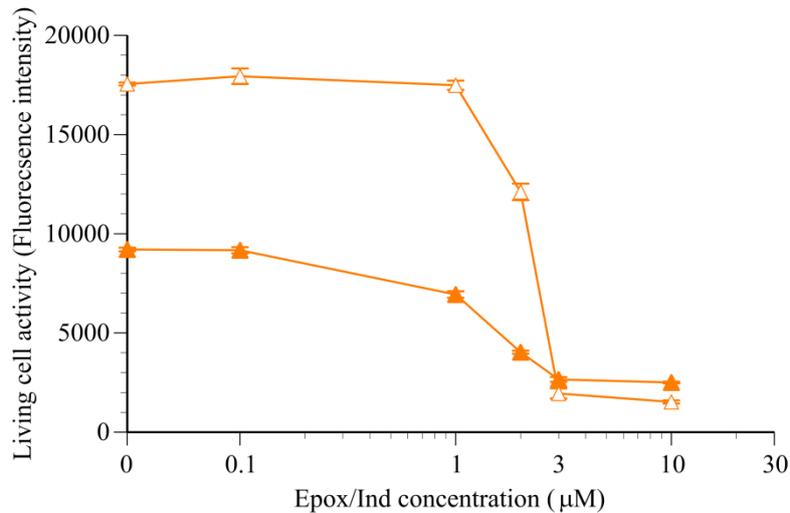
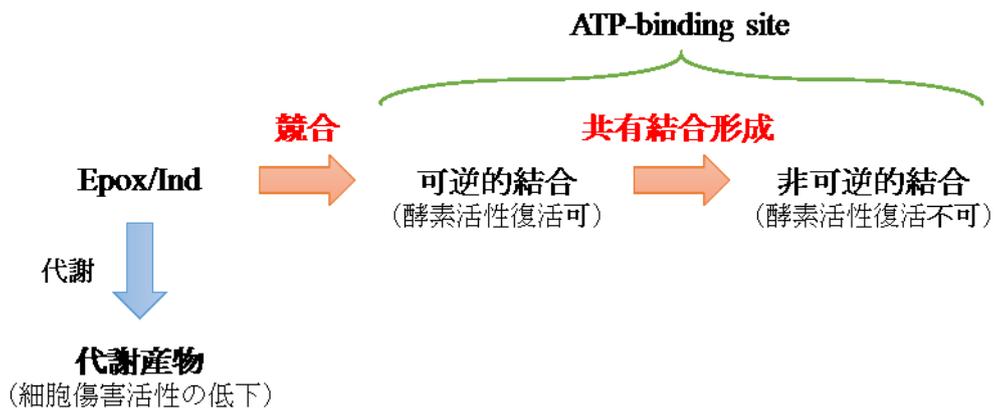


Fig. 9. Epox/Ind の細胞傷害活性に試薬曝露時間が与える影響：24 時間曝露 (▲), 72 時間曝露 (△).



Scheme 3. Epox/Ind の細胞内動態.

Epox/Ind の細胞内動態 (Scheme 3) を考慮すると、24 時間培養時に観察された Epox/Ind の細胞傷害活性は、低濃度域では主として可逆的な阻害であり、培養時間を長期化することにより見掛け上の細胞傷害活性が消失したものと考えられる (添加濃度 1 μM 参照)。なお、可逆的阻害を作用機序とする酵素阻害剤における IC_{50} 値は、阻害剤の特性表現としては適正とされており、上述の 24 時間培養時に算定した IC_{50} 値 (1.7 μM) は、Epox/Ind の特性を表現する適切な因子と考えている。また、この結果は代謝による clearance を示唆しているものとも考えられる。一方、 IC_{50} 値の 2 倍程度以上の添加濃度では、24 時間培養時でも 72

時間培養時でも細胞傷害活性は強く現れている。これは、EpoX/Ind の濃度が高く、阻害タンパク質への競合的結合に有利であることに加え、代謝量を上回る十分量の EpoX/Ind が培養液中に存在しているため、EpoX/Ind は ATP-binding site 内に長期間滞留でき、第二段階の共有結合形成反応が進行する十分な時間があることに由来すると考えている。また、IC₅₀ 値に近い 2 μM 添加時には、十分な可逆的結合と不十分な不可逆的結合の結果、72 時間培養時の細胞傷害活性は 24 時間時に比べて低い評価となったものと考えられる。

第四節 細胞融解液を用いた Epox/Ind の代謝の検討および代謝物の細胞傷害活性の検討

第三節の検討で、代謝による Epox/Ind の細胞傷害活性減弱の可能性が示唆されたことから、細胞傷害活性評価に用いた HepG2 細胞から細胞融解液を調製して、Epox/Ind の代謝様式の検討を行った。HepG2 細胞を 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 中で超音波処理して調製した細胞融解液 (200 μ L, 38.2 mg protein/mL) に Epox/Ind の 10% DMSO 含有 ethanol 溶液 (10 μ L, 1 μ M) を添加し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間 incubate した。反応終了後、methanol (10%) 含有 ethyl acetate (400 μ L) を加えて vortex を用いて十分に混和し、遠心 (1,000 rpm, 5 min.) 後、上清 (100 μ L) を採り減圧乾固した後、残渣を trifluoroacetic acid (TFA) (0.05%) 含有 acetonitrile (CH_3CN) に溶解して高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に付した。Column は、逆相系の ODS column を使用し、検出には UV-VIS 検出器を用い、indirubin 骨格に特徴的な波長 550 nm における吸光度を測定した。移動相に CH_3CN /TFA (0.1%) 含有 H_2O (8:2, v/v) を用い、流速を 1.0 mL/min. とするとき、Epox/Ind の保持時間は 4.3 min. であった。一方、細胞融解液と incubate した試料の有機溶媒抽出画分を HPLC に付すと、保持時間 3.4 min. 付近に新たな peak の出現が認められた (Fig. 10)。

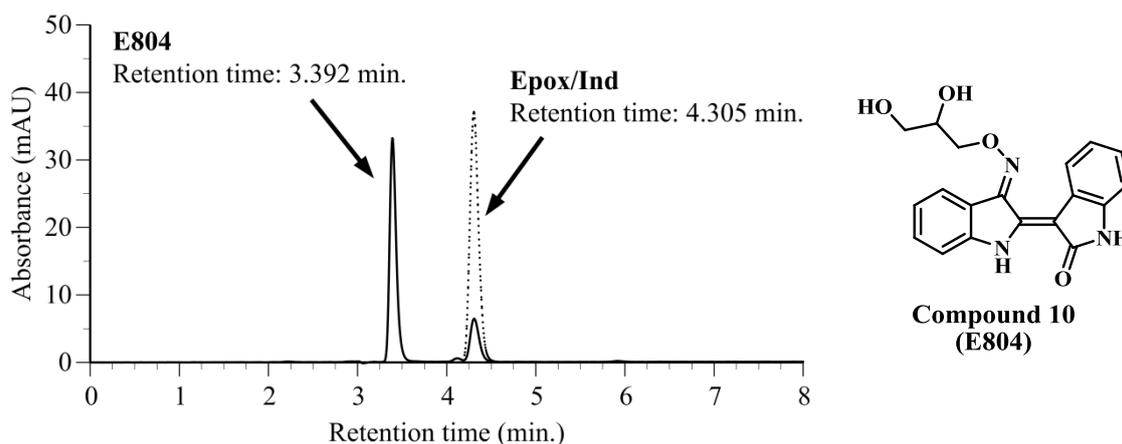


Fig. 10. HepG2 細胞融解液中で Epox/Ind を incubation した際の chromatogram.

筆者は、Epoxy/Ind に比べて高い極性を示すこの代謝産物は oxirane 部分が加水分解を受けた indirubin 3'-(*O*-2,3-dihydroxypropyl)oxime (**10**) であると推定し、Epoxy/Ind 調製と同様の反応条件で Indox に 3-bromopropan-1,2-diol を反応させて合成した。合成標品と代謝産物を上記 HPLC における保持時間および UPLC-MS による保持時間と分子量を比較検討し、ここで見出した Epoxy/Ind の代謝産物が compound **10** であると同定した。なお、compound **10** は、既に E804 として G. Eisenbrand らにより報告されている既知化合物で、細胞傷害活性および stat signaling の阻害活性が見出されている^[33,34]。

そこで、第三節の評価系を利用して、E804 の細胞傷害活性を検討した (Fig. 11)。E804 添加後の培養時間を 24 時間としたとき、細胞生存率は 1 μM では約 80%、3 μM では約 35%であり、グラフから求めた IC_{50} 値は 2.1 μM であった。第三節で求めた Epoxy/Ind の IC_{50} 値が 1.7 μM であったことを考慮すると、この結果は 24 時間培養における E804 の見掛け上の細胞傷害活性は、Epoxy/Ind とほぼ同等であることを示している。一方、試料添加後の培養時間を 72 時間とすると、グラフから求めたそれぞれの IC_{50} 値 (E804: 2.8 μM , Epoxy/Ind: 2.2 μM) に大きな差異は認められないものの、Epoxy/Ind では持続的な細胞傷害活性の発現が認められた 3 μM でも E804 添加では生細胞数の増加が認められた。なお、E804 による持続的細胞傷害活性は、10 μM では観察された。以上の結果、不可逆的な共有結合形成も細胞傷害活性発現機構の一部とする Epoxy/Ind は、標的タンパク質への結合が可逆的である E804 に比べて、抗腫瘍剤としての有用性が高いものと考えられる。

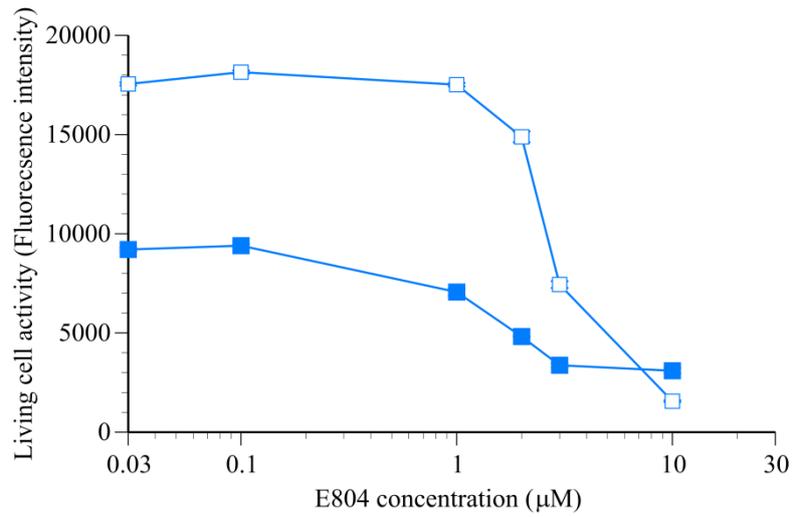


Fig. 11. E804の細胞傷害活性に試薬曝露時間が与える影響:24時間曝露 (■), 72時間曝露 (□).

第五節 第一章のまとめ

ここまでの内容を小括する。Epoxy/Ind は、細胞周期回転を制御する kinase に親和性を有する indirubin 骨格と、thiol 基と共有結合を形成できる oxirane を組み合わせて設計した indirubin 誘導体で、*cis-platin* と同等以上の細胞傷害活性を示す抗腫瘍剤の seed 化合物になり得ることを明らかにすることができた。HepG2 細胞から調製した細胞融解液を用いた生物学的安定性の検討結果から、投与した Epoxy/Ind の一部は、生細胞中で oxirane 部分が加水分解を受け E804 に変換されることで、細胞傷害活性が減弱することが示唆された。一方で、逆相 HPLC 系で Epoxy/Ind より短い保持時間で溶出したことから、水溶性が向上していることが示唆された。水溶性の向上は、細胞外への排泄速度の向上につながるため、oxirane の導入は抗腫瘍剤で問題となる蓄積毒性の軽減にも寄与するものと考えられる。同時に、E804 は stat signaling の阻害作用の他にも、血管新生抑制作用^[35]が報告されている indirubin 誘導体でもあり、Epoxy/Ind は生細胞中で E804 に変換されることで、E804 に由来するこれらの二次的な作用も期待できる indirubin 誘導体である。

第二章 Epox/Br-Ind の開発とその細胞傷害活性の検証

第一節 Epox/Br-Ind の合成

第一章では、Epox/Ind を開発し、その細胞傷害活性ならびに代謝について検討し、その有用性を明らかにした。Epox/Ind の母化合物である Indox は、細胞周期回転の制御に深く関与する CDK や GSK-3 β の ATP-binding site に高い親和性を示す。これら serine/threonine kinase の ATP-binding site は、細胞増殖制御に関与する多くの tyrosine kinase とは構造的に大きく異なっており、そのためこれら酵素を標的とする阻害剤は特異性に優れると考えられている。これまでに報告された Indox を含む indirubin 誘導体は、Indox の oxime 水酸基を足場として新たな原子団を導入したものと、indole 骨格上に置換基を導入したものに大別される。特に indole 骨格の水素原子を臭素原子で置換した bromoindirubin 3'-oxime (Br-Indox) は、母化合物の Indox に比べて細胞傷害活性あるいは kinase 阻害活性が大幅に向上すること、また臭素原子の置換位置により kinase への選択性や細胞傷害活性が大きく変動することが報告されている^[36]。例えば、5-bromoindirubin 3'-oxime (5-Br-Indox, **11**)では、Indox の標的である CDK および GSK-3 β に対する阻害効果ならびに細胞傷害活性の増強が観察される^[37]。また、6-bromoindirubin 3'-oxime (6-Br-Indox)では kinase に対する阻害活性は GSK-3 β においてのみ増強がみられ、CDK に対する影響は少ない。すなわち、6 位に臭素原子を導入すると GSK-3 β に対する選択性が発現する^[38]。7-Bromoindirubin 3'-oxime (7-Br-Indox, **12**)についても高い細胞傷害活性が報告されているが、同時に、この作用は kinase を介さない可能性も示唆されている^[39]。これは、GSK-3 β 等の ATP-binding site において Indox の 7 位付近には十分な空間的余裕がなく、臭素原子が導入されると Indox 誘導体は kinase と安定な complex が形成できなくなる、すなわち親和性が低下する、ためと考えられている。また、indirubin 骨格上の二か所が臭素原子で置換された誘導体 (dibromoindirubin) の生物活性に関する知見もいくつか報告されているが、総じて kinase 阻害活性を有しているとされている^[36]。

以上のような観点から、Epoxy/Ind においても indirubin 骨格への臭素原子の導入は、細胞傷害活性向上の面から有利と考えて Epoxy/Br-Ind の合成を行うこととした。臭素原子の導入位置は、indirubin 骨格の 5, 6, 7, 5', 6' 位とし、一つあるいは二つの臭素原子が置換した Epoxy/Ind 誘導体を調製することとした。なお、4 位置換体は立体障害により合成が不可能であり、7' 位置換体は後述の合成経路の鍵中間体である 7-bromo-2-chloro-3*H*-indol-3-one (**13**) への変換が困難なために合成から除外した。また、4' 位置換体は、4'-bromoindirubin (**14**) の調製は可能ではあるものの、4' 位の臭素原子により 3' 位のカルボニル基が立体障害を受けて oxime 化反応が進行しないため、4'-bromoindirubin 3'-(*O*-oxiran-2-ylmethyl)oxime (**15**) も合成候補化合物から除外した (Fig. 12)。

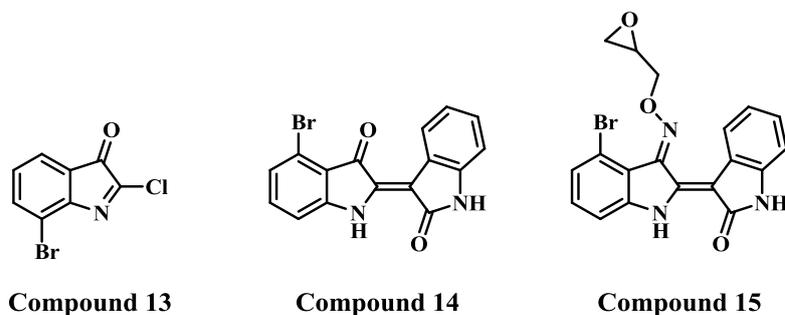


Fig. 12. Indirubin 関連化合物の構造.

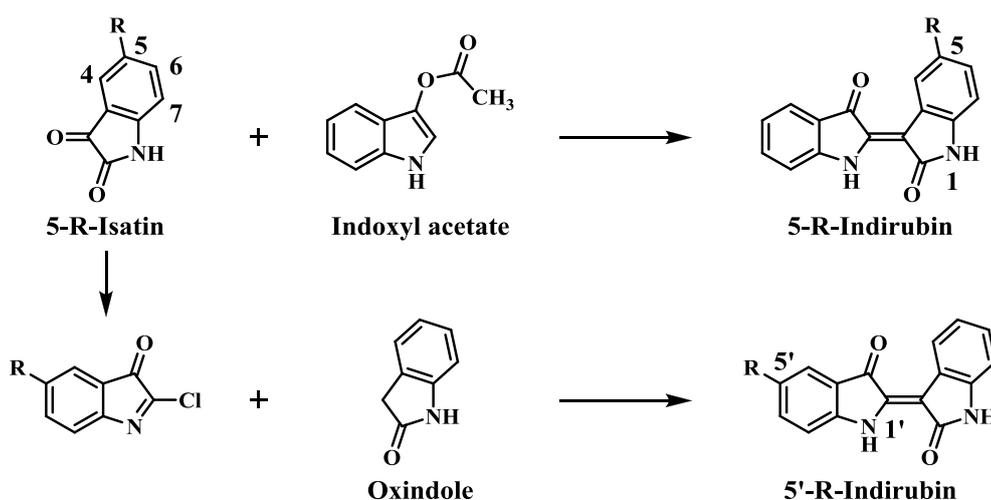
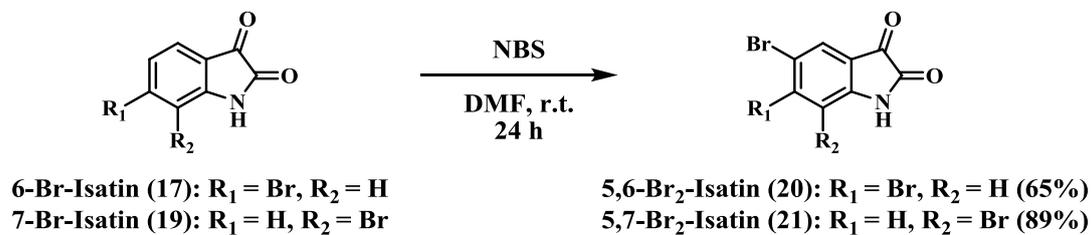
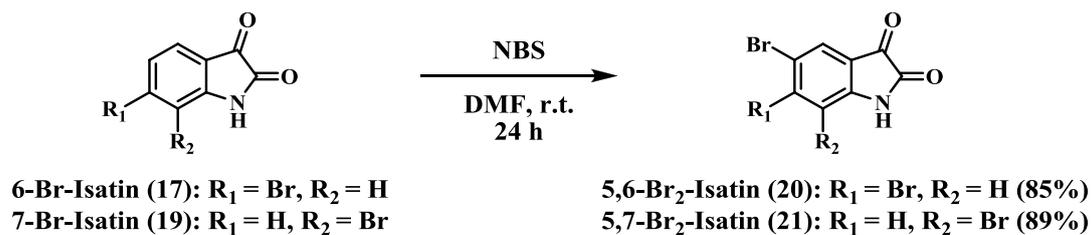
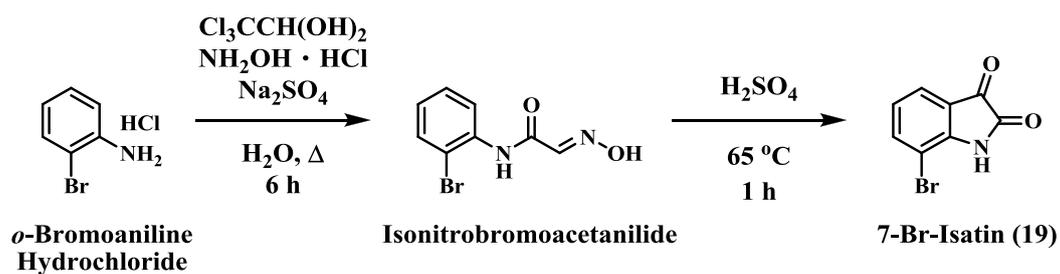


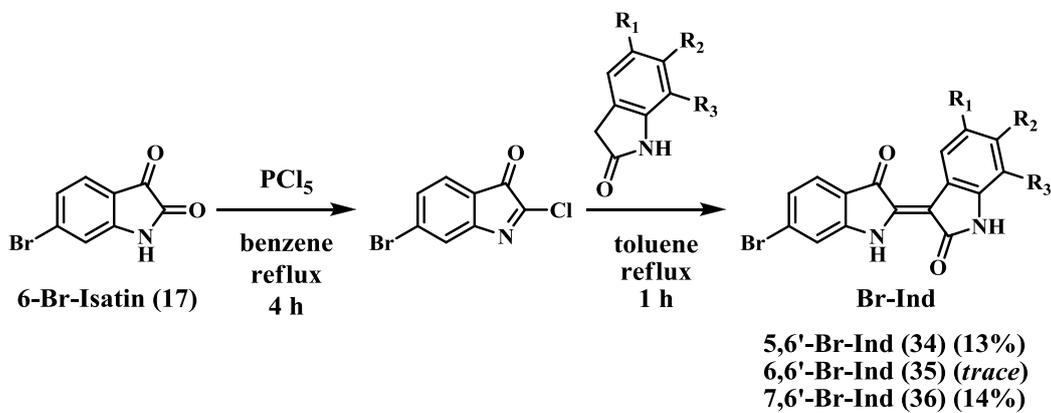
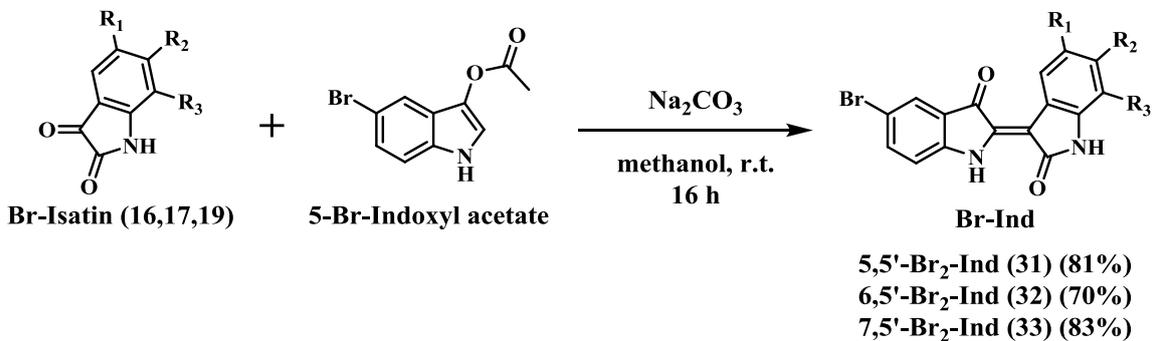
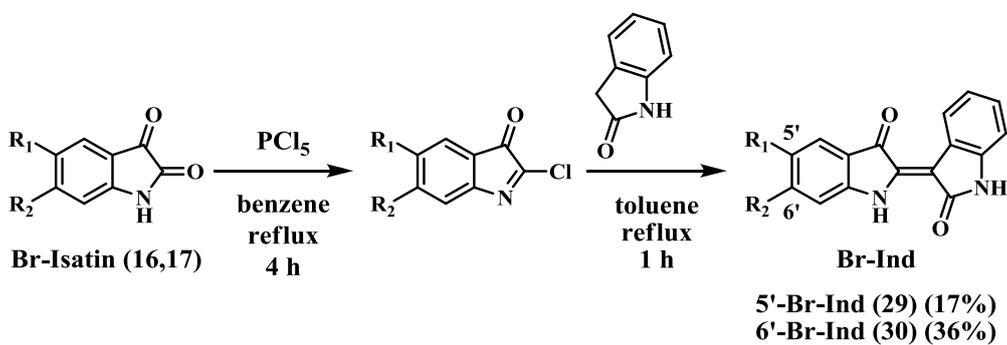
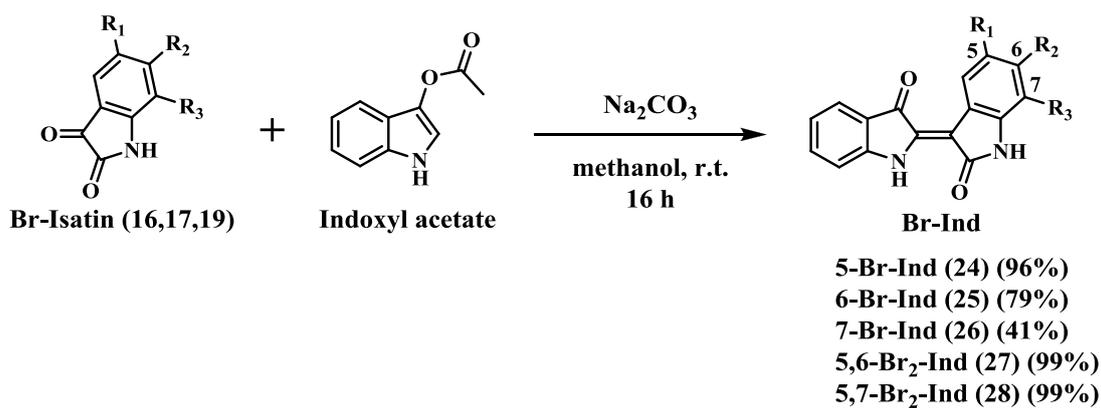
Fig. 13. Indirubin の合成前駆体 isatin の置換基と indirubin の置換位置の関係.

Indirubin の合成法は、isatin を前駆体として第一章で用いた indoxyl acetate あるいは oxindole と縮合することで合成でき、isatin の置換基の位置と縮合反応後の indirubin の置換基の位置の間には **Fig. 13** に示したような関係がある。このため、indole 骨格の水素原子を臭素原子に置換した indirubin の合成は、臭素化した前駆体の調製が必要である。Indoxyl acetate を用いた indirubin の合成は副産物が少なく高い収率で目的物を得ることができるが、indoxyl acetate の合成が煩雑で精製も難しいため、誘導体が購入可能な場合は、それを用いることとした。一方、indoxyl acetate 誘導体の入手が困難な場合は、isatin と oxindole の縮合により indirubin を合成した。本法は、総収率は低いものの、isatin の 3 位 carbonyl 基を Wolff-Kishner 法で還元すると oxindole を得ることができるため、汎用性の高い合成法である。Isatin の調製は、aniline を原料とした合成法が確立されており^[40]、市販品の種類も多く比較的安価に入手可能なものが多い。臭素置換体は市販品の種類が豊富で、5-bromoisatin (5-Br-Isatin, **16**), 6-bromoisatin (6-Br-Isatin, **17**), 5-bromoindoxyl acetate, 5-oxindole (5-Br-Oxindole, **18**) は市販されているため、適宜再結晶して合成に用いた。一方、7-bromoisatin (7-Br-Isatin, **19**) は市販品が非常に高価であったため、安価に入手可能な 2-bromoaniline を出発原料として合成した (**Scheme 4**)。5,6-Dibromoisatin (5,6-Br₂-Isatin, **20**) および 5,7-dibromoisatin (5,7-Br₂-Isatin, **21**) は、6-Br-Isatin および 7-Br-Isatin を原料として *N*-bromosuccinimide (NBS) によって 5 位を臭素化することで合成した (**Scheme 4**)。なお、本法は S. Bartoli らの aniline 誘導体に対する選択的臭素化反応の応用であるが、isatin 誘導体への適用は本研究が初めてである^[41]。また、6-Br-Isatin および 7-Br-Isatin を原料として Wolff-Kishner 反応により 3 位 carbonyl 基を methylene 基に還元することで 6-bromooxindole (6-Br-Oxindole, **22**) および 7-bromooxindole (7-Br-Oxindole, **23**) を得た (**Scheme 4**)。以上の合成原料を用いて、Epoxy/Br-Ind の原料となる bromoindirubin (**24-36**) の合成を行った (**Scheme 5**)。

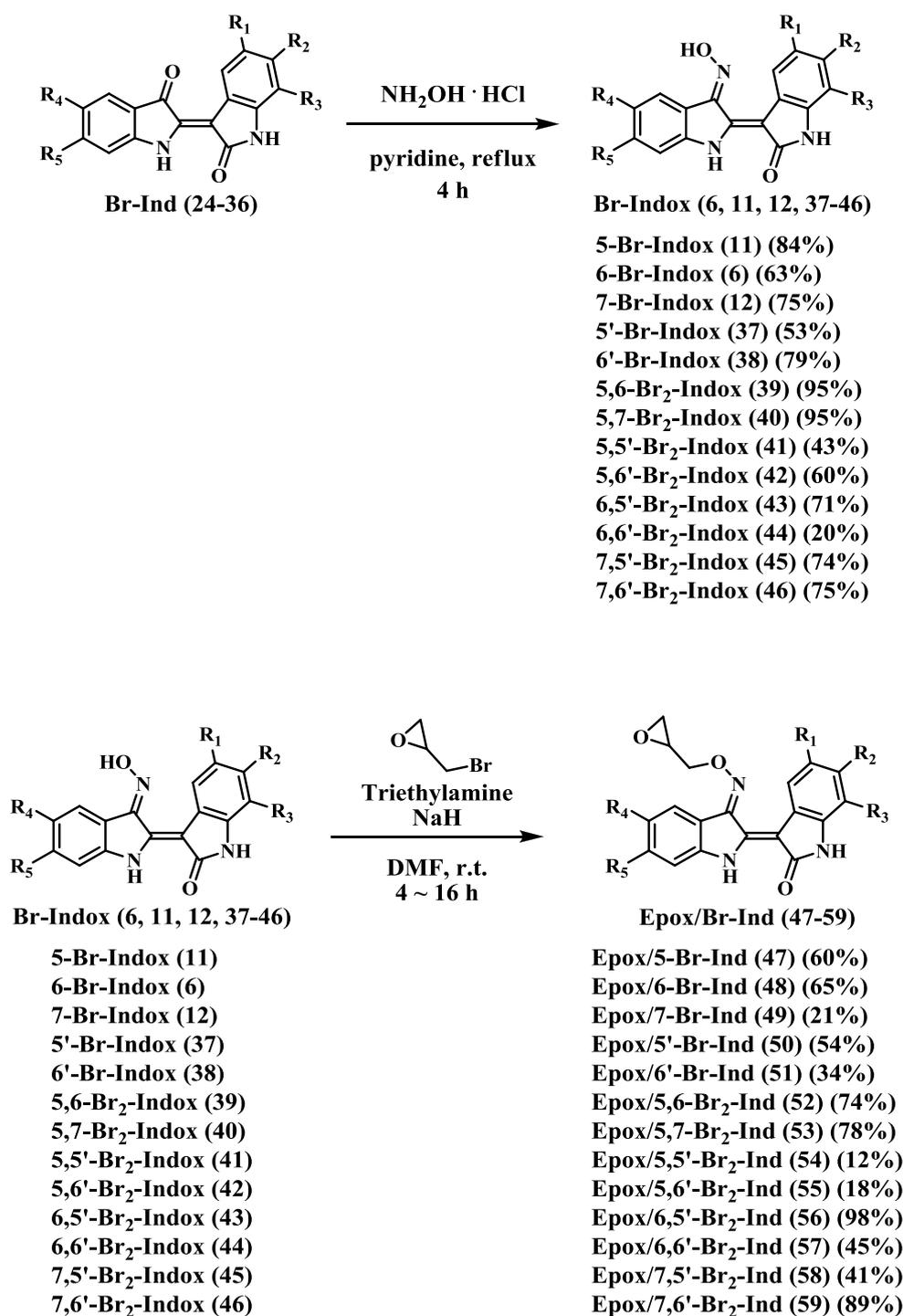
次いで第一章と同様に、indirubin に hydroxylammonium chloride を作用させて Br-Indox (**6, 11, 12, 37-46**) へと導き、第一章第一節で開発した方法で epibrohydrin と反応させて目的とした Epoxy/Br-Ind (**47-59**) を合成した (**Scheme 6**)。



Scheme 4. Bromindirubin 合成原料の調製 : 7-Br-Isatin (19), 5,6-Br₂-Isatin (20), 5,7-Br₂-Isatin (21), 6-Br-Oxindole (22), 7-Br-Oxindole (23) の合成.



Scheme 5. Bromoindirubin (24-36) の合成.



Scheme 6. Br-Indox (6, 11, 12, 37-46) および Epox/Br-Ind (47-59)の合成.

第二節 Epox/Br-Ind の細胞傷害活性と代謝

第一章と同様に細胞傷害活性は、HepG2 細胞を用いた alamarBlue assay[®]による細胞生存率を指標として検討した。培養時間は 24 時間とし、細胞傷害活性の比較には 50%生育阻害濃度 (IC₅₀ 値) を用いた。細胞傷害活性の一覧を **Table 1** に示す。

Table 1. Br-Indox および Epox/Br-Ind の細胞傷害活性

| | IC ₅₀ (μM) | |
|----------------------|-----------------------|-----------|
| | Oxime Form | Epox Form |
| Non-substituted | 15 | 1.7 |
| 5-Br | 6.9 | 0.62 |
| 6-Br | 5.3 | >100 |
| 7-Br | 4.8 | 37 |
| 5'-Br | 11 | 3.3 |
| 6'-Br | 14 | 4.5 |
| 5,6-Br ₂ | 4.4 | 1.9 |
| 5,7-Br ₂ | 6.6 | 8.8 |
| 5,5'-Br ₂ | 7.0 | 2.5 |
| 5,6'-Br ₂ | > 100 | >100 |
| 6,5'-Br ₂ | 3.2 | >100 |
| 6,6'-Br ₂ | 16 | >100 |
| 7,5'-Br ₂ | 4.9 | 10 |
| 7,6'-Br ₂ | 17 | >100 |

まず、Indox 系化合物の IC₅₀ 値を比較すると、6 位および 5'位に臭素原子を導入した dibromoindirubin 3'-oxime (Br₂-Indox) 誘導体である 6,5'-Br₂-Indox (**43**) が最も低い値 (3.2 μM) を示し、Indox の 6 位と 5'位両方に臭素原子を導入すると細胞傷害活性は約 5 倍に増強されることが判明した。Monobromoindirubin 3'-oxime (Br-Indox) を見ると、5 位、6 位あるいは 7 位に臭素原子を導入するといずれにおいても IC₅₀ は小さくなり、本評価系においても細胞傷害活性は 2~3

倍に増幅されることが示され、Indox 分子への臭素原子の導入の有効性を示唆した既報の知見を確認する結果が得られた^[36-39]。一方、5'位あるいは6'位にのみ臭素原子を導入しても細胞傷害活性の向上は図れないことも明らかになった。次に、Br₂-Indox についてそれらの細胞傷害活性を比較すると、5位に加えて6位、7位あるいは5'位に臭素原子を導入した二置換体では、IC₅₀値は4.4~7.0 μMであり、5-Br-Indox (**11**) の6.9 μMと比較すると5,6-Br₂-Indox (**39**) において若干の増強が認められたが、他の部位への臭素原子の導入は細胞傷害活性に有意な改善をもたらすことはなかった。また、5位の他に6'位にも臭素原子を導入した5,6'-Br₂-Indox (**42**) のIC₅₀値は100 μM以上となり、5位と6'位の両方に臭素原子を導入すると細胞傷害活性は消失することが判明した。6位に臭素原子を持つBr₂-Indox では、さらに5'位あるいは6'位に臭素原子が存在する場合には、前述のごとく6,5'-Br₂-Indox が最も高い傷害活性を示したが、6'位に臭素原子を導入した6,6'-Br₂-Indox (**44**) のIC₅₀値は16 μMであり、6-Br-Indox (**6**) は5.3 μMであることから、この場合も6'位への臭素原子の導入は傷害活性の低下を示した。なお、5位にも臭素原子を導入した5,6-Br₂-Indox (**39**) では4.4 μMであり、若干の改善が認められた。さらに7位に臭素原子を導入した7-Br-Indox では、5'位に2つ目の臭素原子を導入しても細胞傷害活性に変動は認められなかったが(4.8 μM → 4.9 μM)、この場合も6'位に二つ目の臭素原子を導入した場合にはIC₅₀値は17 μMとなり、細胞傷害活性は低下した。これまでに述べてきたことを小括すると、

1. Mono 置換体においては、5位、6位あるいは7位に臭素原子を導入すると、Indox の細胞傷害活性は2~3倍に増強された。
2. Mono 置換体においては、5'位あるいは6'位への臭素原子の導入は、Indox の細胞傷害活性に大きな影響をもたらさなかった。
3. 5位に臭素原子を持つ5-Br-Indox に、さらに6位、7位あるいは5'位に臭素原子を導入しても、5-Br-Indox の細胞傷害活性に大きな影響は生じなかった。一方、6'位への臭素原子の導入は著しい細胞傷害活性の低下を招

いた。

4. 6位に臭素原子を持つ6-Br-Indoxに、さらに5'位に臭素原子を導入すると60%程度の細胞傷害活性の上昇が観られた。一方、この場合も6'位に臭素原子を導入すると細胞傷害活性が約3分の1に低下した。
5. 7位に臭素原子を持つ7-Br-Indoxに、さらに5'位に臭素原子を導入しても細胞傷害活性に影響は観られなかったが、ここでも6'位に臭素原子を導入すると細胞傷害活性が約3分の1に低下した。

以上、Br-Indoxにおいては、5位、6位または7位への臭素原子を導入は細胞傷害活性の向上に有効であるが5'位、6'位への導入は効果が無く、Br₂-Indoxにおいては、5-Br-Indox (11)、6-Br-Indox (6)、7-Br-Indox (12) の5'位への臭素原子の導入は細胞傷害活性の改善に若干の寄与がある場合も認められたが、その効果は限定的であった。一方、6'位の臭素原子の導入は細胞傷害活性の低下をもたらすことが判明した。このようなIndoxの臭素化における詳細な構造活性相関に関する知見は、未だ報告されておらず、本研究が初めてである。

次いで、Epoxy/Ind系化合物のIC₅₀値を比較する。Indoxの場合と同様に、monobromo置換体であるEpoxy/Br-Indについてまとめると、5位への臭素原子の導入は極めて良好な結果を与えた。すなわち、臭素原子の導入によりIC₅₀値が1.7 μMから0.62 μMとなり、細胞傷害活性が約3倍に上昇したが、対照的に6位、7位への臭素原子の導入は細胞傷害活性の顕著な低下をもたらした。Indoxでの検討で細胞傷害活性への臭素原子導入の影響が少ないとした5'位、6'位は、Epoxy/Br-Indの場合でも同様に細胞傷害活性への影響は負の効果ではあったが前二者に比べると小さく、細胞傷害活性は2~3分の1に低下したのみであった。また、dibromo置換体(Epoxy/Br₂-Ind)については、5位臭素置換体のEpoxy/5-Br-Ind (47) の6位、7位、5'位、6'位のいずれの位置に臭素原子を導入してもIC₅₀値は3倍以上の高値を示し、細胞傷害活性の低下が確認された。とりわけ6'位への導入はEpoxy/5-Br-IndにおいてもBr-Indoxの場合と同様に著しい細胞傷害活性の低下をもたらした。6位に臭素原子をもつEpoxy/6-Br-Ind (48) の5'位あるいは6'位

に臭素原子を導入しても細胞傷害活性の改善は認められず、7位に臭素原子をもつ Epox/7-Br-Ind (49) においても6'位への臭素の導入は望ましくない結果を与えた。なお、5'位への導入では若干の改善があった。この結果、Epox/Ind においては、5位への臭素原子の導入のみが有効で、他の位置への導入は細胞傷害活性の低下をもたらすことが明らかになった。

一方、Indox 系化合物への oxirane 導入の効果という面から見ると、Indox では細胞傷害活性が 8.8 倍に上昇したが、5-Br-Indox では 11 倍となった。また、他の改善が見られた 5'-Br-Indox (37)、6'-Br-Indox (38)、5,6-Br₂-Indox (39)、5,5'-Br₂-Indox (41) では 2.3 ~ 3.3 倍程度であった。この結果は、一般性はないものの、抗腫瘍剤開発において競合型酵素阻害剤への epoxide 基導入が一つの有効な選択肢となることを示唆している。

なお、細胞傷害活性評価において Epox/5-Br-Ind の IC₅₀ 値が 620 nM であったことは特筆すべきことであり、この低濃度化の機序の解明はさらに Epox/Ind 系化合物の抗腫瘍剤としての brush-up につながるものである。

第三節 Epox/Br-Ind の不可逆的細胞傷害活性発現における時間および濃度依存性と代謝の検討

引き続き、第一章第三節に準じて培養時間と見掛けの細胞傷害活性および代謝に関する検討を行った。まず、前章に倣い 24 時間培養時の細胞傷害活性と 72 時間培養時のそれを比較した (Fig. 14)。第一章で述べた様に、Epox/Ind はまず競合的に kinase の ATP-binding site 内に侵入し、可逆的に kinase を阻害して細胞傷害活性を発現する。培養系内に代謝量を上回る十分量の Epox/Ind が存在すると、Epox/Ind は ATP-binding site に長時間留まることができ、その結果共有結合を形成することができ、細胞傷害活性を維持できるようになる。Epox/Ind の場合は、その濃度が 3 μM であった。一方、24 時間培養時に求めた Epox/5-Br-Ind の IC_{50} 値は、Epox/Ind の約 3 分の 1 であることから、ここでは検討する添加濃度を 3 μM に加えて 1 μM も設定した。なお、以下の記述では、細胞傷害活性は試料非添加時の細胞生存率と添加時の細胞生存率の差 (%DCV) として表記する。前章と同じ 3 μM 添加時の結果 (Fig. 14B) を見ると、前章の結果と同様に Epox/Ind では 24 時間培養時 (%DCV: 62%) に比べて 72 時間培養時 (%DCV: 93%) においてより強い細胞傷害活性が観察された。同様の傾向は Epox/5-Br-Ind、Epox/5'-Br-Ind、Epox/6'-Br-Ind でも観察され、それぞれの %DCV の 24 時間培養時から 72 時間培養時への変化は、68%→92%、70%→83%、74%→88%であった。一方、1 μM 添加時の結果を比較すると、72 時間培養で見掛けの細胞傷害活性の増強が観察された化合物は Epox/5-Br-Ind のみであった。なお、その変化は 67%→91%であった。これは、24 時間培養で算出した IC_{50} 値を基に推測した結果と良い一致を示している。

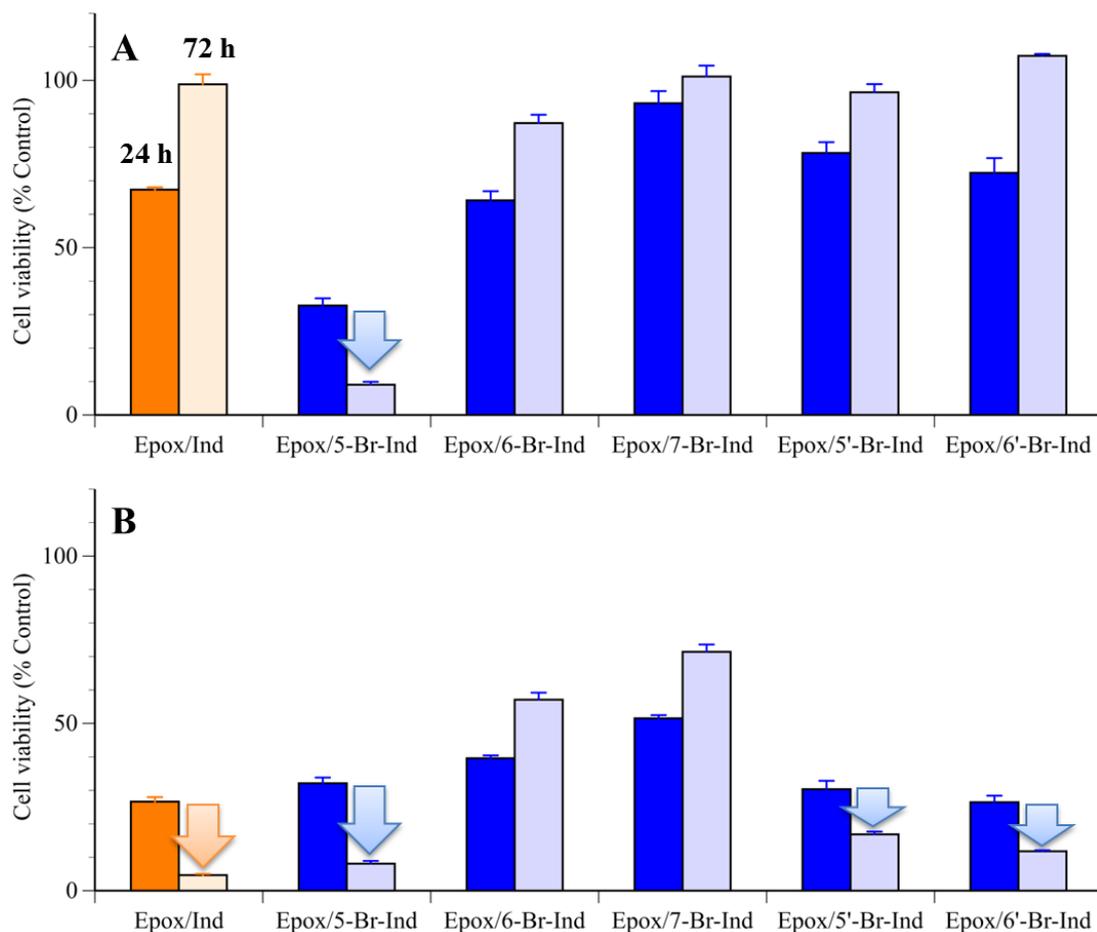


Fig. 14. Epox/Ind (3) および Epox/Br-Ind (47-51) の細胞傷害活性と試薬曝露時間 (24 h, 72 h) の関係; A: 添加濃度 1 μ M, B: 添加濃度 3 μ M.

次いで、代謝について検討した。第一章においても 72 時間培養時に観察される見掛け上の細胞傷害活性の強さに代謝による clearance が影響していることを考察した。そこで、HepG2 細胞から調製した細胞融解液を用いて Epox/5-Br-Ind の代謝を検討した。前章と同様に Epox/5-Br-Ind を細胞融解液中で incubate し、反応液から有機溶媒抽出画分を調製した。前章の HPLC の分離条件を用いて抽出画分中の成分を分析した。Epox/5-Br-Ind の保持時間は 5.2 min.であったのに対して保持時間 3.7 min.に新たな peak の出現が認められた (Fig. 15)。筆者は、Epox/Ind の場合と同様に新たに出現した peak の成分は epoxide 環が加水分解を受けた代謝産物、すなわち 5-bromoindirubin 3'-(O-2,3-dihydroxypropyl)oxime (60) であると想定した。そこで前章の方法に準じて 5-Br-Indox (11) と 3-bromo propane-1,2-diol から標品を調製して HPLC および UPLC-MS における保持時間お

よび分子イオンの分子量等を比較した。その結果、筆者はこの代謝産物が epoxide 環部位の加水分解物 (E804 の 5 位臭素化体) であると同定した。Epoxy/Ind は HepG2 細胞融解中で incubate することで vehicle control と比較して peak area が約 80% 消失し、E804 の peak が現れた (Fig. 10)。一方、Epoxy/5-Br-Ind の消失率は約 60% の消失に留まり、HepG2 細胞によって加水分解を受けにくいことが示された。Epoxy/Ind の 5 位を Br で置換すると、kinase への親和性が向上とすることと併せて、hydrolase の基質となりにくくなるため、Epoxy/Ind と比較して細胞傷害活性が低下しにくくなり、強力な細胞傷害活性を示すようになったと考えられる。

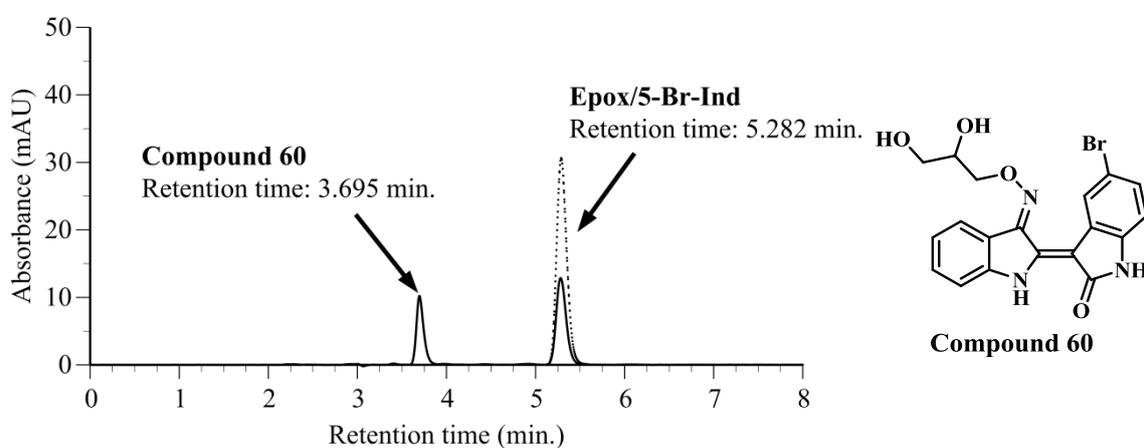


Fig. 15. HepG2 細胞融解液中で Epoxy/5-Br-Ind を incubate した際の chromatogram.

結語

Tailor-made 医療という概念が提唱されるようになって久しい昨今では、個々の患者の病歴や遺伝子型によって異なる病原因子を標的とした分子標的薬の開発研究が目覚ましく発展している。特に抗腫瘍剤の開発においては、mitogen 受容体型 tyrosine kinase を標的とする従来の kinase 阻害剤開発から、mitogen signal cascade の下流に位置する serine/threonine kinase を標的とした kinase 阻害剤を seed 化合物とする新規抗悪性腫瘍剤の開発へと注目点が変わってきている。筆者は、細胞周期回転を制御する serine/threonine kinase に親和性を有する indirubin 骨格に着目し、より強力な kinase 阻害剤の開発を企図し、アミノ酸残基のアルキル化を目的に oxirane 構造を有する Epox/Ind を設計した。Indirubin 骨格は、GSK-3 β や CDK に対して特に高い親和性を有し、kinase の ATP-binding site で ATP と拮抗して kinase のタンパク質リン酸化を阻害するものである。特に、GSK-3 β や CDK の ATP-binding site には機能発現に重要な cysteine 残基が存在することがわかっており、oxirane の導入はこれらの cysteine 残基を重要な標的残基と捉えて選択したものである。

以上のような分子設計に基づいて開発した Epox/Ind は、実際に HepG2 細胞に対する 50%生育阻害濃度 (IC₅₀) が母化合物である Indox の約 10 分の 1 に低下し (Epox/Ind: 1.7 μ M, Indox: 15 μ M)、GSK-3 β や CDK などの可逆的 kinase 阻害作用のみを有する Indox と比較して、細胞傷害活性の大幅な増強が認められた。Epox/Ind の化学的アルキル化様式は、生体内環境を模倣した反応条件下で、同一分子内に thiol 基と alcohol 性 hydroxy 基を有する 2-mercaptoethanol との反応によって確認し、Epox/Ind が thiol 基と共有結合を形成すること、およびその結合形成位置を特定した。そこで、Epox/Ind によるアミノ酸残基、特に thiol 基との共有結合形成は、細胞傷害活性の増強のみならず、効果の持続化に大きく寄与すると考え、細胞傷害活性を作用持続時間の点から再検証した。HepG2 に対する Epox/Ind の曝露時間を 24 時間と 72 時間の 2 点において比較すると、Epox/Ind を添加してから 24 時間の間に認められる細胞傷害活性は、主に indirubin 骨格に由来する可逆的 kinase 阻害作用によるものであると推測された。更に Epox/Ind

の可逆的 kinase 阻害作用は、EpoX/Ind 添加から長時間が経過すると減弱化することも示唆された。一方、EpoX/Ind を添加してから 72 時間の時点で認められる細胞傷害活性は、主に oxirane 構造に由来する非可逆的 kinase 阻害作用によるものであると推測された。IC₅₀ 値の 2 倍程度以上の添加濃度では、24 時間培養時でも 72 時間培養時でも細胞傷害活性は強く現れ、EpoX/Ind が十分量存在すると、EpoX/Ind の細胞内濃度が若干低下しても、残存する EpoX/Ind の濃度が十分であれば ATP-binding site 内に長期間滞留し、共有結合形成反応が進行するために強力な持続的な細胞傷害活性が発揮されると考えられる。

EpoX/Ind の作用の減弱化は、EpoX/Ind の構造的長所である oxirane 部位が代謝を受けたからではないかと仮定し、生物学的安定性を検討した。HepG2 細胞の高濃度融解液中で EpoX/Ind を incubate し、反応液の有機溶媒抽出画分を調製して、HPLC にて EpoX/Ind の残存率を調べたところ、incubate 時間 1 時間で約 80% の消失が認められた。また、同時に保持時間 3.4 min. に新たな peak の出現が認められた。新たな peak は、逆相溶媒系で EpoX/Ind (保持時間 4.3 min.) よりも保持時間が短かったことから、未知化合物は EpoX/Ind の oxirane 部位が加水分解を受けて diol 構造となった indirubin 3'-(*O*-2,3-dihydroxypropyl)oxime であると推定し、標品を合成、HPLC の保持時間と併せて UPLC-MS による分子量確認で同一化合物であると確認した。EpoX/Ind の diol 型代謝物は E804 と呼ばれる既知の化合物であり、細胞傷害活性に関する知見がいくつか報告されていたため、EpoX/Ind と E804 の細胞傷害活性を比較した。結果、HepG2 細胞に対して 24 時間曝露した際の IC₅₀ 値はわずかに EpoX/Ind が低い程度で (EpoX/Ind: 1.7 μM, E804: 2.1 μM) 可逆的 kinase 阻害作用に大きな差はなかった。一方で、EpoX/Ind の oxirane 構造のような非可逆的 kinase 阻害作用が期待される官能基をもたない E804 は、可逆的 kinase 阻害作用のみのため、曝露から 72 時間時間経過後まで持続的な細胞傷害活性を発揮するには EpoX/Ind の 3 倍以上の濃度を要した。以上のことから、EpoX/Ind は代謝による E804 への変換でも細胞傷害活性が減弱すると考えられる。しかし E804 は、stat signaling の阻害や、血管新生抑制作用などが報告されている indirubin 誘導体であり、EpoX/Ind は E804 に変換されることで、E804 に由来するこれらの二次的な作用も期待できる indirubin 誘導体であることが示された。また、代謝によって水溶性の向上と細胞傷害活性の減弱が認めら

れることは、Epoxy/Ind の oxirane 構造が、抗腫瘍剤でしばしば問題視される蓄積毒性の軽減にも寄与する構造であると言える。

ここまでの検証結果から、Epoxy/Ind は新規抗腫瘍剤の seed 化合物として有望な化合物であるとの結論を得た。筆者は細胞傷害活性ならびに腫瘍細胞選択性向上のため、Epoxy/Ind の母化合物である Indox の細胞傷害活性の検討結果が参考になると考え、Indox の細胞傷害活性が向上したとの報告がある Br-Indox および Br₂-Indox に着目した。そこで、Epoxy/Ind の細胞傷害活性増強を期待して、芳香環上に臭素原子を導入した Epoxy/Br-Ind および Epoxy/Br₂-Ind 計 13 種を新規に合成し、それらの細胞傷害活性を検討した。その結果、indirubin 骨格の 5 位に臭素を導入した Epoxy/5-Br-Ind に Epoxy/Ind より高い細胞傷害活性が見出された (IC₅₀ = 620 nM)。Epoxy/5-Br-Ind は、母化合物である 5-Br-Indox の細胞傷害活性を 11 倍に増強した。これは、Epoxy/Ind への変換が Indox の細胞傷害活性を 8.8 倍に増強した結果を更に上回る強力な効果であった。IC₅₀ 値が Epoxy/Ind の約 3 分の 1 にまで低下した Epoxy/5-Br-Ind は、Epoxy/Ind において持続的な細胞傷害活性の発揮に必要な 3 μM の 3 分の 1 にあたる 1 μM でも、同等の持続的な細胞傷害活性が認められた。更に、Epoxy/5-Br-Ind は Epoxy/Ind と同様に oxirane 部分が加水分解した E804 の 5 位臭素化体に変換することも確認したため、Epoxy/Ind と同様に diol 型に変換して細胞傷害活性が減弱すると予想される。しかし、同一条件で比較した時、Epoxy/Ind は HPLC 上で peak の 80%が消失して E804 に変換するのに対して、Epoxy/5-Br-Ind の peak 消失は 60%にとどまった。これは、Epoxy/Ind の 5 位に臭素を導入することが、細胞傷害活性の面からも作用持続時間の面からも優れた誘導体化であることを示している。

Epoxy/Ind は、既存の強力な抗腫瘍剤である *cis-platin* と同等以上の細胞傷害活性を示す有力な抗腫瘍剤の seed 化合物であり、その細胞傷害活性は 5 位に臭素を導入する事で大きく増強されることが示された。Indirubin 骨格は、細胞周期関連 serine/threonine kinase と高い親和性を示すという点で注目されている一方、骨格の平面性が高いため水溶性に乏しいという欠点がある。Epoxy/Ind の開発は、indirubin 誘導体の生物活性を増強し、投与量を軽減させるという点において indirubin の創薬に寄与する方法論の開発である。また、indirubin 骨格への置換基の導入によって Epoxy/Ind の生物活性は更に増強されることを筆者は見出した。

今後、Epox/Ind 分子のさらなる分子最適化によって新規抗腫瘍剤の開発につながることを期待する。

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、終始懇切なご指導ご鞭撻を賜りました指導教員の日本大学薬学部 宮入伸一教授に深く感謝いたします。

学位論文審査において、貴重なご指導とご助言を頂いた日本大学薬学部 高畠亨教授、飯島洋教授に心から感謝いたします。

有益なるご助言を数多く賜りました日本大学薬学部 三宅宗晴准教授、内山武人准教授に心から感謝いたします。また、日本大学薬学部 齋藤弘明助教には日常の議論を通じて、熱心かつ丁寧なご指導と暖かい激励を賜りました。ここに記して深甚の謝意を表します。

各種機器分析を行っていただいた他、主論文の執筆にあたってご尽力いただいた日本大学薬学部機器分析センター 目鳥幸一博士に心から感謝いたします。

本研究は、藤井矯氏ならびに梅原美乃氏をはじめ日本大学薬学部 有機化学研究室に在籍した多くの卒業研究生の卒業研究生の強力によって完遂されました。ここに記して厚く御礼申し上げます。また、日本大学大学院薬学研究科 薬品分子化学研究室 今井美湖氏には、学部生活を含めて長い間多くのご助力を頂きましたことに深く感謝し御礼申し上げます。同時に、学部および大学院生活で共に過ごし、多くを共有することができた諸先輩方、同級生、後輩諸氏に心から感謝します。

最後に、あらゆる面で長い研究生活を支えてくれた両親、家族、知人に深く感謝します。

2016年 春

実験の部

Chemical synthesis

Apparatus

核磁気共鳴スペクトル (NMR)

¹H-NMR spectra は、JEOL JNM-ECX500 (500 MHz) spectrometers を用いて測定し、tetramethylsilane (TMS) を内標準物質 (tetramethylsilane; δ_{H} 0.00, DMSO-*d*₆; 2.50, Chloroform-*d*; 7.26) とした。表記には、以下の略号を用いている : Chemical shift (δ , ppm), multiplicity (*s* = singlet, *d* = doublet, *dd* = doublet of doublets, *ddd* = doublet of doublet of doublets, *dt* = doublet of triplets, *t* = triplet, *td* = triplet of doublets, *m* = multiplet, *bs* = broad singlet)。

質量分析 (MS)

Electron impact (EI) mass analyses および fast atom bombardment (FAB) mass analyses は、JEOL JMS-GCMATE を用いて測定した。

融点 (mp)

Melting points は、AS ONE ATM-01 を用いて測定した。

Chromatography

Column chromatography は、Wakogel C-200 (100-200 mesh) または Kanto Silica gel 60N (63-210 mesh) を使用した。Thin-layer chromatography は、Merck Keisigel 60 F₂₅₄ plate を使用した。

General procedures

Method I: General procedure for preparation of indirubin derivatives.

Isatin (**4**) (1.47 g, 10 mmol) と indoxyl acetate (1.75 g, 10 mmol, 1 molEq) を methanol (anhydrous) (300 mL) に完全に溶解し、室温で攪拌しながら argon gas を穏やかに bubbling した。30 分後、sodium carbonate, Na₂CO₃ (2.33 g, 22 mmol, 2.2 molEq) を加えて室温で攪拌した。Na₂CO₃ 添加から 3 時間後、argon gas の bubbling を停止し、更に 16 時間攪拌を継続した。反応終了後、析出物を吸引濾取し、濾

液が中性になるまで水洗した。粗生成物を加温減圧下乾燥後、1,4-dioxane/*n*-hexane から再結晶して精製し、indirubin (**1**) 2.25 g (Yield: 86 %) を結晶として得た。

Method II: General procedure for preparation of **indirubins derivatives**.

Argon 雰囲気下、6-bromoisatin (**17**) (1.13 g, 5.0 mmol) と phosphoric chloride (1.04 g, 5.0 mmol, 1 molEq) を benzene (anhydrous) (5 mL) 中で加熱還流した。4 時間後、反応溶媒を減圧下留去し、oxindole (665 mg, 5.0 mmol, 1 molEq) を加えて toluene (anhydrous) (5 mL) 中で加熱還流した。1 時間後、反応液を放冷し、固化した粗生成物に toluene (5 mL) を加えて slurry 状にしてから吸引濾取した。得られた粗生成物を加温減圧下乾燥後、methanol/dichloromethane から再結晶して精製し、6'-bromoindirubin (**30**) 620 mg (Yield: 36 %) を結晶として得た。

Method III: General procedure for preparation of **indox derivatives**.

Indirubin (**1**) (1.31 g, 5.0 mmol) と hydroxylammonium hydrochloride (3.47 g, 50 mmol, 10 molEq) を pyridine (20 mL) 中で加熱還流した。4 時間後、反応液を放冷してから H₂O (100 mL) を加えて室温で 10 分間攪拌した。析出物を吸引濾取し、加温減圧下乾燥後、methanol/dichloromethane から再結晶して精製し、indirubin 3'-oxime (**2**) 1.29 g (Yield: 93 %) を結晶として得た。

Method IV: General procedure for preparation of **Epox/Ind derivatives**.

Argon 雰囲気下、indirubin 3'-oxime (**1**) (277 mg, 1.0 mmol) を *N,N*-dimethyl formamide (super dehydrated) (5 mL) に溶解し、triethylamine (280 μ L, 2.0 mmol, 2 molEq) および sodium hydride, NaH (60% in paraffin liquid) (80 mg, 2.0 mmol, 2 molEq) を加えて室温で攪拌した。30 分後、epibromohydrin (815 μ L, 10 mmol, 10 molEq) を加えて攪拌を継続した。16 時間後、反応液に H₂O (30 mL) を加えて室温で 10 分攪拌した。析出物を吸引濾取し、加温減圧下乾燥後、aqueous 1,4-dioxane から再結晶して精製し、indirubin 3'-(*O*-oxiran-2-ylmethyl)oxime (**3**) 257 mg (Yield: 77 %) を結晶として得た。

Analytical data of indirubin derivatives

Indirubin (1): Ind

Yield: 86%, mp. >300 °C. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.91 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, 7-H), 7.00-7.05 (2H, *m*, 5-H and 5'-H), 7.26 (1H, *td*, *J* = 7.7 and 1.1 Hz, 6-H), 7.43 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, 7'-H), 7.58 (1H, *td*, *J* = 7.7 and 1.1 Hz, 6'-H), 7.66 (1H, *d*, *J* = 7.4 Hz, 4'-H), 8.77 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, 4-H), 10.92 (1H, *s*, 1-H), 11.04 (1H, *s*, 1'-H). LR-MS (EI): 262 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₆H₁₀N₂O₂; 262.0742. *Found*: 262.0740.

5-Bromoindirubin (24): 5-Br-Ind

Prepared by **method I** with minor modifications. Yield: 96%, mp. >300 °C (1,4-dioxane/*n*-hexane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.85 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, 7-H), 7.03 (1H, *t*, *J* = 7.3 Hz, 5'-H), 7.36-7.42 (2H, *m*, 6- and 7'-H), 7.57 (1H, *t*, *J* = 7.7 Hz, 6'-H), 7.64 (1H, *d*, *J* = 7.5 Hz, 4'-H), 8.91 (1H, *d*, *J* = 1.8 Hz, 4-H), 11.10 (2H, *bs*, 1- and 1'-H). LR-MS (EI): 340 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₆H₉N₂O₂Br; 339.9847. *Found*: 339.9843.

6-Bromoindirubin (25): 6-Br-Ind

Prepared by **method I** with minor modifications. Yield: 79%, mp. >300 °C (1,4-dioxane/*n*-hexane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.03 (1H, *t*, *J* = 7.5 Hz, 5'-H), 7.05 (1H, *d*, *J* = 1.7 Hz, 7-H), 7.21 (1H, *dd*, *J* = 8.3 and 2.0 Hz, 5-H), 7.42 (1H, *d*, *J* = 8.1 Hz, 7'-H), 7.59 (1H, *t*, *J* = 7.6 Hz, 6'-H), 7.65 (1H, *d*, *J* = 7.5 Hz, 4'-H), 8.68 (1H, *d*, *J* = 6.6 Hz, 4-H), 11.10 (2H, *bs*, 1- and 1'-H). LR-MS (EI): 340 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₆H₉N₂O₂Br; 339.9847. *Found*: 339.9849.

7-Bromoindirubin (26): 7-Br-Ind

Prepared by **method I** with minor modifications. Yield: 41%, mp. >300 °C (1,4-dioxane/*n*-hexane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.99 (1H, *t*, *J* = 7.9 Hz, 5-H), 7.05 (1H, *td*, *J* = 7.4 and 0.8 Hz, 5'-H), 7.43 (1H, *dd*, *J* = 8.0 and 0.9 Hz, 7'-H), 7.44 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, 6-H), 7.60 (1H, *td*, *J* = 7.7 and 1.3 Hz, 6'-H), 7.67 (1H, *d*, *J* = 7.5 Hz, 4'-H), 8.77 (1H, *dd*, *J* = 7.7 and 0.9 Hz, 4-H), 11.16 (1H, *bs*, 1-H), 11.18 (1H, *bs*,

1'-H). LR-MS (EI): 340 ($[M]^+$). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₆H₉N₂O₂Br; 339.9847. *Found*: 339.9855.

5'-Bromoindirubin (27): 5'-Br-Ind

Prepared by **method II** with minor modifications. Yield: 17%, mp. >300 °C (methanol/dichloromethane subsequently acetone). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.90 (1H, *d*, *J* = 7.5 Hz, 7-H), 7.03 (1H, *td*, *J* = 7.8 and 1.2 Hz, 5-H), 7.27 (1H, *td*, *J* = 7.7 and 1.1 Hz, 6-H), 7.41 (1H, *d*, *J* = 8.6 Hz, 7'-H), 7.73 (1H, *dd*, *J* = 8.6 and 2.0 Hz, 6'-H), 7.78 (1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, 4'-H), 8.75 (1H, *dd*, *J* = 7.4 Hz, 4-H), 10.93 (1H, *bs*, 1-H), 11.12 (1H, *bs*, 1'-H). LR-MS (EI): 340 ($[M]^+$). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₆H₉N₂O₂Br; 339.9847. *Found*: 339.9850.

6'-Bromoindirubin (30): 6'-Br-Ind

Prepared by **method II** with minor modifications. Yield: 36%, mp. >300 °C (1,4-dioxane/*n*-hexane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.90 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, 7-H), 7.02 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, 5-H), 7.19 (1H, *dd*, *J* = 8.0 and 1.7 Hz, 5'-H), 7.27 (1H, *t*, *J* = 7.7 Hz, 6-H), 7.73 (1H, *d*, *J* = 8.1 Hz, 4'-H), 7.68 (1H, *d*, *J* = 1.8 Hz, 7'-H), 8.76 (1H, *dd*, *J* = 7.7 Hz, 4-H), 10.97 (1H, *bs*, 1-H), 11.11 (1H, *bs*, 1'-H). LR-MS (EI): 340 ($[M]^+$). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₆H₉N₂O₂Br; 339.9847. *Found*: 339.9848.

5,6-Dibromoindirubin (27): 5,6-Br₂-Ind

Prepared by **method I** with minor modifications. Yield: 99%, mp. >300 °C (1,4-dioxane/*n*-hexane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.04 (1H, *d*, *J* = 7.5 Hz, 5'-H), 7.17 (1H, *s*, 7-H), 7.41 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, 7'-H), 7.58 (1H, *t*, *J* = 7.8 Hz, 6'-H), 7.63 (1H, *d*, *J* = 7.5 Hz, 4'-H), 9.03 (1H, *s*, 4-H), 11.10 (2H, *bs*, 1- and 1'-H). LR-MS (EI): 418 ($[M]^+$). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₆H₈N₂O₂Br₂; 417.8952. *Found*: 417.8955.

5,5'-Dibromoindirubin (31): 5,5'-Br₂-Ind

Prepared by **method I** with minor modifications. Yield: 81%, mp. >300 °C (1,4-dioxane/*n*-hexane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.87 (1H, *d*, *J* = 8.3 Hz,

7-H), 7.41 (1H, *d*, $J = 8.3$ Hz, 7'-H), 7.43 (1H, *dd*, $J = 8.3$ and 2.0 Hz, 6-H), 7.75 (1H, *dd*, $J = 8.6$ and 2.0 Hz, 6'-H), 7.79 (1H, *d*, $J = 2.0$ Hz, 4'-H), 8.91 (1H, *d*, $J = 2.1$ Hz, 4-H), 11.15 (2H, *bs*, 1- and 1'-H). LR-MS (EI): 418 ($[M]^+$). HR-MS (EI): *Calcd for* $C_{16}H_8N_2O_2Br_2$; 417.8952. *Found*: 417.8950.

5,6'-Dibromoindirubin (34): 5,6'-Br₂-Ind

Prepared by **method II** with minor modifications. Yield: 13%, mp. >300 °C (methanol/dichloromethane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.05 (1H, *d*, $J = 2.0$ Hz, 7-H), 7.22 (1H, *dd*, $J = 8.2$ and 1.6 Hz, 5'-H), 7.43 (1H, *dd*, $J = 8.3$ and 2.0 Hz, 7'-H), 7.60 (1H, *d*, $J = 8.0$ Hz, 4'-H), 7.68 (1H, *d*, $J = 1.4$ Hz, 7'-H), 8.93 (1H, *d*, $J = 2.0$ Hz, 4-H), 11.14 (2H, *bs*, 1- and 1'-H). LR-MS (EI): 418 ($[M]^+$). HR-MS (EI): *Calcd for* $C_{16}H_8N_2O_2Br_2$; 417.8952. *Found*: 417.8951.

6,5'-Dibromoindirubin (32): 6,5'-Br₂-Ind

Prepared by **method I** with minor modifications. Yield: 70%, mp. >300 °C (1,4-dioxane/*n*-hexane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.05 (1H, *d*, $J = 2.0$ Hz, 7-H), 7.22 (1H, *dd*, $J = 8.6$ and 2.0 Hz, 5-H), 7.40 (1H, *d*, $J = 8.6$ Hz, 6-H), 7.74 (1H, *dd*, $J = 8.5$ and 2.2 Hz, 6'-H), 7.78 (1H, *d*, $J = 1.8$ Hz, 4'-H), 8.65 (1H, *d*, $J = 8.6$ Hz, 4-H), 11.06 (1H, *bs*, 1-H), 11.17 (1H, *bs*, 1'-H). LR-MS (EI): 418 ($[M]^+$). HR-MS (EI): *Calcd for* $C_{16}H_8N_2O_2Br_2$; 417.8952. *Found*: 417.8953.

6,6'-Dibromoindirubin (35): 6,6'-Br₂-Ind

Prepared by **method II** with minor modifications. Yield: *tarce*, mp. >300 °C (methanol/dichloromethane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.05 (1H, *s*, 7-H), 7.21 (2H, *t*, $J = 9.8$ and 9.2 Hz, 5- and 5'-H), 7.58 (1H, *d*, $J = 8.9$ Hz, 4'-H), 7.68 (1H, *s*, 7'-H), 8.67 (1H, *d*, $J = 8.9$ Hz, 4-H), 11.15 (2H, *bs*, 1- and 1'-H). MS (EI): 418 ($[M]^+$). HR-MS (EI): *Calcd for* $C_{16}H_8N_2O_2Br_2$; 417.8952. *Found*: 417.8951.

7,5'-Dibromoindirubin (33): 7,5'-Br₂-Ind

Prepared by **method I** with minor modifications. Yield: 83%, mp. >300 °C

(1,4-dioxane/*n*-hexane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.98 (1H, *t*, *J* = 7.9 Hz, 5-H), 7.35-7.48 (2H, *m*, 6- and 7'-H), 7.73 (1H, *d*, *J* = 8.3 Hz, 6'-H), 7.77 (1H, *s*, 4'-H), 8.73 (1H, *d*, *J* = 7.5 Hz, 4-H), 11.20 (2H, *bs*, 1- and 1'-H). MS (EI): 418 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₆H₈N₂O₂Br₂; 417.8952. *Found*: 417.8952.

7,6'-Dibromoindirubin (36): 7,6'-Br²-Ind

Prepared by **method II** with minor modifications. Yield: 14 %, mp. >300 °C (methanol/dichloromethane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.99 (1H, *t*, *J* = 8.0 Hz, 5-H), 7.22 (1H, *dd*, *J* = 8.0 and 1.7 Hz, 5'-H), 7.45 (1H, *dd*, *J* = 8.2 and 1.0 Hz, 6-H), 7.59 (1H, *d*, *J* = 8.1 Hz, 4'-H), 7.69 (1H, *d*, *J* = 1.5 Hz, 7'-H), 8.76 (1H, *dd*, *J* = 7.7 and 0.9 Hz, 4-H), 11.20 (1H, *s*, 1-H), 11.25 (1H, *s*, 1'-H). LR-MS (EI): 418 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₆H₈N₂O₂Br₂; 417.8952. *Found*: 417.8954.

Analytical data of indirubin 3'-oxime derivatives

Indirubin 3'-oxime (2): Indox

Yield: 93%, mp. 273 °C. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.92 (1H, *d*, *J* = 7.6 Hz, 7-H), 6.97 (1H, *td*, *J* = 7.6 and 1.1 Hz, 5-H), 7.01-7.07 (1H, *m*, 5'-H), 7.15 (1H, *td*, *J* = 7.6 and 1.1 Hz, 6-H), 7.44-7.49 (2H, *m*, 6'- and 7'-H), 8.24 (1H, *d*, *J* = 7.6 Hz, 4'-H), 8.66 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, 4-H), 10.75 (1H, *s*, 1-H), 11.74 (1H, *s*, 1'-H), 13.54 (1H, *s*, 3'-N-OH). LR-MS (EI): 277 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₆H₁₁N₃O₂; 277.0851. *Found*: 277.0848.

5-Bromoindirubin 3'-oxime (11): 5-Br-Indox

Prepared by **method III** with minor modifications. Yield: 84%, mp. >300 °C (aqueous ethanol). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.84 (1H, *d*, *J* = 8.4 Hz, 7-H), 7.06 (1H, *td*, *J* = 7.3 and 1.6 Hz, 5'-H), 7.27 (1H, *dd*, *J* = 8.3 and 1.4 Hz, 7'-H), 7.38-7.46 (2H, *m*, 6- and 6'-H), 8.25 (1H, *d*, *J* = 7.3 Hz, 4'-H), 8.76 (1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, 4-H), 10.83 (1H, *s*, 1-H), 11.86 (1H, *s*, 1'-H), 13.72 (1H, *s*, 3'-N-OH). LR-MS (EI): 355 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₆H₁₀N₃O₂Br; 354.9956. *Found*: 354.9954.

6-Bromoindirubin 3'-oxime (6): 6-Br-Indox

Prepared by **method III** with minor modifications. Yield: 63%, mp. >300 °C (aqueous ethanol). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.03 (1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, 7-H), 7.05 (1H, *td*, *J* = 7.3 and 1.6 Hz, 5'-H), 7.09 (1H, *dd*, *J* = 8.4 and 1.9 Hz, 5-H), 7.38-7.46 (2H, *m*, 6'- and 7'-H), 8.23 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, 4'-H), 8.56 (1H, *d*, *J* = 8.4 Hz, 4-H), 10.85 (1H, *s*, 1-H), 11.77 (1H, *s*, 1'-H), 13.62 (1H, *s*, 3'-N-OH). LR-MS (EI): 355 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₆H₁₀N₃O₂Br; 354.9956. *Found*: 354.9953.

7-Bromoindirubin 3'-oxime (12): 7-Br-Indox

Prepared by **method III** with minor modifications. Yield: 75%, mp. 293 °C (methanol/dichloromethane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.90 (1H, *t*, *J* = 8.0 Hz, 5-H), 7.06 (1H, *t*, *J* = 7.5 Hz, 5'-H), 7.28 (1H, *d*, *J* = 8.1 Hz, 7'-H), 7.37-7.47 (2H, *m*, 6- and 6'-H), 8.25 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, 4'-H), 8.68 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, 4-H), 10.92 (1H, *s*,

1-H), 11.92 (1H, *s*, 1'-H), 13.60 (1H, *s*, 3'-N-OH). MS (EI): 355 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₆H₁₀N₃O₂Br; 354.9956. *Found*: 354.9949.

5'-Bromoindirubin 3'-oxime (37): 5'-Br-Indox

Prepared by **method III** with minor modifications. Yield: 53%, mp. 272-273 °C (aqueous ethanol). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.89 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, 7-H), 6.94 (1H, *t*, *J* = 7.9 Hz, 5-H), 7.13 (1H, *t*, *J* = 7.6 Hz, 6-H), 7.40 (1H, *d*, *J* = 8.4 Hz, 7'-H), 7.56 (1H, *m*, *J* = 8.4 and 1.9 Hz, 6'-H), 8.36 (1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, 4'-H), 8.63 (1H, *d*, *J* = 7.6 Hz, 4-H), 10.71 (1H, *s*, 1-H), 11.81 (1H, *s*, 1'-H), 13.74 (1H, *s*, 3'-N-OH). LR-MS (EI): 355 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₆H₁₀N₃O₂Br; 354.9956. *Found*: 354.9956.

6'-Bromoindirubin 3'-oxime (38): 6'-Br-Indox

Prepared by **method III** with minor modifications. Yield: 79%, mp. >300 °C (aqueous ethanol). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.89 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, 7-H), 6.95 (1H, *t*, *J* = 7.7 Hz, 5-H), 7.13 (1H, *t*, *J* = 7.5 Hz, 6-H), 7.18 (1H, *d*, *J* = 8.1 Hz, 5'-H), 7.68 (1H, *s*, 7'-H), 8.14 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, 4'-H), 8.64 (1H, *d*, *J* = 8.1 Hz, 4-H), 10.73 (1H, *s*, 1-H), 11.78 (1H, *s*, 1'-H), 13.58 (1H, *s*, 3'-N-OH). LR-MS (EI): 355 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₆H₁₀N₃O₂Br; 354.9956. *Found*: 354.9965.

5,6-Dibromoindirubin 3'-oxime (39): 5,6-Br₂-Indox

Prepared by **method III** with minor modifications. Yield: 95%, mp. >300 °C (methanol/1,4-dioxane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.07 (1H, *td*, *J* = 7.5 and 1.0 Hz, 5'-H), 7.18 (1H, *s*, 7-H), 7.43 (1H, *td*, *J* = 7.5 and 1.0 Hz, 6'-H), 7.46 (1H, *d*, *J* = 7.5 Hz, 7'-H), 8.24 (1H, *d*, *J* = 7.5 Hz, 4'-H), 8.90 (1H, *s*, 4-H), 10.94 (1H, *s*, 1-H), 11.83 (1H, *s*, 1'-H) 13.79 (1H, *s*, 3'-N-OH). LR-MS (EI): 433 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₆H₉N₃O₂Br₂; 432.9061. *Found*: 432.9054.

5,7-Dibromoindirubin 3'-oxime (40): 5,7-Br₂-Indox

Prepared by **method III** with minor modifications. Yield: 95%, mp. >300 °C. ¹H-NMR

(500 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.10 (1H, *td*, $J = 7.5$ and 1.2 Hz, 5'-H), 7.43 (1H, *td*, $J = 7.7$ and 1.0 Hz, 6'-H), 7.47-7.51 (2H, *m*, 6- and 7'-H), 8.25 (1H, *d*, $J = 7.7$ Hz, 4'-H), 8.80 (1H, *d*, $J = 1.6$ Hz, 4-H), 11.11 (1H, *s*, 1-H), 11.98 (1H, *s*, 1'-H) 13.86 (1H, *s*, 3'-N-OH). LR-MS (EI): 433 ($[M]^+$). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₆H₉N₃O₂Br₂; 432.9061. *Found*: 432.9056.

5,5'-Dibromoindirubin 3'-oxime (41): 5,5'-Br₂-Indox

Prepared by **method III** with minor modifications. Yield: 43 %, mp. >300 °C (ethanol). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.84 (1H, *d*, $J = 8.0$ Hz, 7-H), 7.29 (1H, *dd*, $J = 8.4$ and 1.9 Hz, 6-H), 7.44 (1H, *d*, $J = 8.4$ Hz, 7'-H), 7.60 (1H, *dd*, $J = 8.4$ and 1.9 Hz, 6'-H), 8.35 (1H, *d*, $J = 2.0$ Hz, 4'-H), 8.75 (1H, *d*, $J = 1.9$ Hz, 4-H), 10.86 (1H, *s*, 1-H), 11.86 (1H, *s*, 1'-H) 13.96 (1H, *s*, 3'-N-OH). LR-MS (EI): 433 ($[M]^+$). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₆H₉N₃O₂Br₂; 432.9061. *Found*: 432.9053.

5,6'-Dibromoindirubin 3'-oxime (42): 5,6'-Br₂-Indox

Prepared by **method III** with minor modifications. Yield: 60 %, mp. >300 °C (ethanol). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.85 (1H, *d*, $J = 8.1$ Hz, 7-H), 7.22 (1H, *dd*, $J = 8.3$ and 1.8 Hz, 5'-H), 7.28 (1H, *dd*, $J = 8.0$ and 1.9 Hz, 6-H), 7.71 (1H, *d*, $J = 1.9$ Hz, 7'-H), 8.16 (1H, *d*, $J = 8.1$ Hz, 4'-H), 8.76 (1H, *d*, $J = 1.9$ Hz, 4-H), 10.87 (1H, *s*, 1-H), 11.87 (1H, *s*, 1'-H) 13.84 (1H, *s*, 3'-N-OH). LR-MS (EI): 433 ($[M]^+$). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₆H₉N₃O₂Br₂; 432.9061. *Found*: 432.9061.

6,5'-Dibromoindirubin 3'-oxime (43): 6,5'-Br₂-Indox

Prepared by **method III** with minor modifications. Yield: 71 %, mp. 290 °C (ethanol). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.03 (1H, *d*, $J = 1.9$ Hz, 7-H), 7.10 (1H, *dd*, $J = 8.4$ and 1.9 Hz, 5-H), 7.42 (1H, *d*, $J = 8.4$ Hz, 7'-H), 7.59 (1H, *dd*, $J = 8.7$ and 2.2 Hz, 6'-H), 8.32 (1H, *d*, $J = 2.3$ Hz, 4'-H), 8.53 (1H, *d*, $J = 8.4$ Hz, 4-H), 10.88 (1H, *s*, 1-H), 11.78 (1H, *s*, 1'-H) 13.91 (1H, *s*, 3'-N-OH). LR-MS (EI): 433 ($[M]^+$). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₆H₉N₃O₂Br₂; 432.9061. *Found*: 432.9061.

6,6'-Dibromoindirubin 3'-oxime (44): 6,6'-Br₂-Indox

Prepared by **method III** with minor modifications. Yield: 20 %, mp. >300 °C (ethanol).
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.03 (1H, *s*, 7-H), 7.10 (1H, *d*, *J* = 8.4 Hz, 5-H), 7.22 (1H, *d*, *J* = 8.4 Hz, 5'-H), 7.70 (1H, *s*, 7'-H), 8.13 (1H, *d*, *J* = 8.4 Hz, 4'-H), 8.55 (1H, *d*, *J* = 8.4 Hz, 4-H), 10.89 (1H, *s*, 1-H), 11.77 (1H, *s*, 1'-H) 13.74 (1H, *s*, 3'-N-OH). LR-MS (EI): 433 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₆H₉N₃O₂Br₂; 432.9061. *Found*: 432.9056.

7,5'-Dibromoindirubin 3'-oxime (45): 7,5'-Br₂-Indox

Prepared by **method III** with minor modifications. Yield: 74 %, mp. >300 °C (ethanol).
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.89 (1H, *t*, *J* = 7.9 Hz, 5-H), 7.30 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, 6-H), 7.42 (1H, *d*, *J* = 8.4 Hz, 7'-H), 7.58 (1H, *d*, *J* = 8.5 Hz, 6'-H), 8.32 (1H, *d*, *J* = 1.9 Hz, 4'-H), 8.62 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, 4-H), 10.94 (1H, *s*, 1-H), 11.87 (1H, *s*, 1'-H) 13.94 (1H, *s*, 3'-N-OH). LR-MS (EI): 433 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₆H₉N₃O₂Br₂; 432.9061. *Found*: 432.9061.

7,6'-Dibromoindirubin 3'-oxime (46): 7,6'-Br₂-Indox

Prepared by **method III** with minor modifications. Yield: 75 %, mp. 293 °C (ethanol).
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.88 (1H, *t*, *J* = 8.0 Hz, 5-H), 7.19 (1H, *dd*, *J* = 8.0 and 1.5 Hz, 5'-H), 7.29 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, 6-H), 7.69 (1H, *s*, 7'-H), 8.10 (1H, *d*, *J* = 8.4 Hz, 4'-H), 8.62 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, 4-H), 11.03 (1H, *s*, 1-H), 11.93 (1H, *s*, 1'-H) 13.84 (1H, *s*, 3'-N-OH). LR-MS (EI): 433 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₆H₉N₃O₂Br₂; 432.9061. *Found*: 432.9063.

Analytical data of Epox/Ind derivativs

Indirubin 3'-(O-oxiran-2-ylmethyl)oxime (3): Epox/Ind

Yield: 77%, mp. 243 °C. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.78-2.84 (1H, *m*, one of oxiran-methylene-H), 2.93 (1H, *td*, *J* = 4.8 and 1.4 Hz, one of oxiran-methylene-H), 3.48-3.54 (1H, *m*, oxiran-methyne-H), 4.45 (1H, *ddd*, *J* = 12.3, 6.5 and 1.1 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 4.91 (1H, *ddd*, *J* = 12.3, 2.9 and 1.1 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 6.90 (1H, *d*, *J* = 7.8 Hz, 7-H), 7.00 (1H, *t*, *J* = 7.6 Hz, 5-H), 7.05 (1H, *t*, *J* = 7.3 Hz, 5'-H), 7.16 (1H, *t*, *J* = 7.5 Hz, 6-H), 7.43 (1H, *d*, *J* = 7.3 Hz, 7'-H), 7.45 (1H, *t*, *J* = 8.2 Hz, 6'-H), 8.16 (1H, *d*, *J* = 7.4 Hz, 4'-H), 8.63 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, 4-H), 10.79 (1H, *s*, 1-H), 11.69 (1H, *s*, 1'-H). LR-MS (EI): 333 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₉H₁₅N₃O₃; 333.1113. *Found*: 333.1113.

5-Bromoindirubin 3'-(O-oxiran-2-ylmethyl)oxime (47): Epox/5-Br-Ind

Prepared by **method IV** with minor modifications. Yield: 60%, mp. 249-250 °C (ethanol/dichloromethane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.81-2.86 (1H, *m*, one of oxiran-methylene-H), 2.94 (1H, *t*, *J* = 4.6 Hz, oxiran-methylene-H), 3.53-3.59 (1H, *m*, oxiran-methyne-H), 4.46 (1H, *dd*, *J* = 12.5 and 6.7 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 4.89 (1H, *dd*, *J* = 12.3 and 2.7 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 6.86 (1H, *d*, *J* = 8.4 Hz, 7-H), 7.08 (1H, *td*, *J* = 6.7 and 2.7 Hz, 5'-H), 7.31 (1H, *d*, *J* = 8.1 Hz, 7'-H), 7.43-7.51 (2H, *m*, 6- and 6'-H), 8.16 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, 4'-H), 8.84 (1H, *s*, 4-H), 10.94 (1H, *s*, 1-H), 11.75 (1H, *s*, 1'-H). LR-MS (EI): 411 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₉H₁₄N₃O₃Br; 411.0218. *Found*: 411.0217.

6-Bromoindirubin 3'-(O-oxiran-2-ylmethyl)oxime (48): Epox/6-Br-Ind

Prepared by **method IV** with minor modifications. Yield: 65%, mp. 250 °C (methanol/dichloromethane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.81 (1H, *dd*, *J* = 5.0 and 2.7 Hz, one of oxiran-methylene-H), 2.92 (1H, *t*, *J* = 4.6 Hz, one of oxiran-methylene-H), 3.47-3.52 (1H, *m*, oxiran-methyne-H), 4.46 (1H, *dd*, *J* = 12.5 and 6.7 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 4.93 (1H, *dd*, *J* = 12.2 and 2.7 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 7.03 (1H, *d*, *J* = 1.5 Hz, 7-H), 7.07 (1H, *td*, *J* = 8.4 and 2.0 Hz, 5'-H), 7.31 (1H, *dd*, *J* = 8.4

and 1.9 Hz, 5-H), 7.43-7.49 (2H, *m*, 6'- and 7'-H), 8.16 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, 4'-H), 8.56 (1H, *d*, *J* = 8.4 Hz, 4-H), 10.93 (1H, *s*, 1-H), 11.70 (1H, *s*, 1'-H). LR-MS (EI): 411 ($[M]^+$). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₉H₁₄N₃O₃Br; 411.0218. *Found*: 411.0217.

7-Bromoindirubin 3'-(*O*-oxiran-2-ylmethyl)oxime (49): Epox/7-Br-Ind

Prepared by **method IV** with minor modifications. Yield: 21%, mp. 250 °C (methanol/dichloromethane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.81 (1H, *dd*, *J* = 5.1 and 2.8 Hz, one of oxiran-methylene-H), 2.93 (1H, *t*, *J* = 4.7 Hz, one of oxiran-methylene-H), 3.47-3.52 (1H, *m*, oxiran-methyne-H), 4.46 (1H, *dd*, *J* = 12.4 and 6.8 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 4.94 (1H, *dd*, *J* = 12.3 and 2.9 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 6.96 (1H, *t*, *J* = 7.9 Hz, 5-H), 7.05-7.11 (1H, *m*, 5'-H), 7.33 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, 6-H), 7.44-7.50 (2H, *m*, 6'- and 7'-H), 8.16 (1H, *d*, *J* = 7.5 Hz, 4'-H), 8.65 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, 4-H), 11.00 (1H, *s*, 1-H), 11.82 (1H, *s*, 1'-H). LR-MS (EI): 411 ($[M]^+$). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₉H₁₄N₃O₃Br; 411.0218. *Found*: 411.0216.

5'-Bromoindirubin 3'-(*O*-oxiran-2-ylmethyl)oxime (50): Epox/5'-Br-Ind

Prepared by **method IV** with minor modifications. Yield: 54%, mp. 262 °C (methanol/dichloromethane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.81 (1H, *dd*, *J* = 5.2 and 2.6 Hz, one of oxiran-methylene-H), 2.93 (1H, *t*, *J* = 4.7 Hz, one of oxiran-methylene-H), 3.48-3.54 (1H, *m*, oxiran-methyne-H), 4.47 (1H, *dd*, *J* = 12.4 and 6.6 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 4.94 (1H, *dd*, *J* = 12.5 and 2.8 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 6.90 (1H, *t*, *J* = 7.5 Hz, 7-H), 7.00 (1H, *t*, *J* = 7.7 Hz, 5-H), 7.17 (1H, *t*, *J* = 7.6 Hz, 6-H), 7.43 (1H, *d*, *J* = 8.6 Hz, 7'-H), 7.63 (1H, *dd*, *J* = 8.6 and 2.0 Hz, 6'-H), 8.26 (1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, 4'-H), 8.60 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, 4-H), 10.81 (1H, *s*, 1-H), 11.72 (1H, *s*, 1'-H). LR-MS (EI): 411 ($[M]^+$). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₉H₁₄N₃O₃Br; 411.0218. *Found*: 411.0217.

6'-Bromoindirubin 3'-(*O*-oxiran-2-ylmethyl)oxime (51): Epox/6'-Br-Ind

Prepared by **method IV** with minor modifications. Yield: 34%, mp. 246-247 °C (methanol/dichloromethane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.81 (1H, *dd*, *J* = 5.4

and 2.8 Hz, one of oxiran-methylene-H), 2.92 (1H, *t*, *J* = 4.6 Hz, one of oxiran-methylene-H), 3.47-3.52 (1H, *m*, oxiran-methylene-H), 4.47 (1H, *dd*, *J* = 12.5 and 6.8 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 4.91 (1H, *dd*, *J* = 12.3 and 2.9 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 6.90 (1H, *t*, *J* = 7.5 Hz, 7-H), 7.00 (1H, *t*, *J* = 7.6 Hz, 5-H), 7.17 (1H, *t*, *J* = 7.5 Hz, 6-H), 7.22 (1H, *d*, *J* = 8.3 Hz, 5'-H), 7.71 (1H, *s*, 7'-H), 8.06 (1H, *d*, *J* = 8.3 Hz, 4'-H), 8.62 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, 4-H), 10.82 (1H, *s*, 1-H), 11.72 (1H, *s*, 1'-H). LR-MS (EI): 411 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₉H₁₄N₃O₃Br; 411.0218. *Found*: 411.0218.

5,6-Dibromoindirubin 3'-(*O*-oxiran-2-ylmethyl)oxime (52): Epox/5,6-Br₂-Ind

Prepared by **method IV** with minor modifications. Yield: 74 %, mp. 269 °C (aqueous 1,4-dioxane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.82 (1H, *dd*, *J* = 5.5 and 2.5 Hz, one of oxiran-methylene-H), 2.94 (1H, *t*, *J* = 5.0 Hz, one of oxiran-methylene-H), 3.52-3.58 (1H, *m*, oxiran-methylene-H), 4.45 (1H, *dd*, *J* = 12.3 and 6.8 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 4.89 (1H, *dd*, *J* = 12.3 and 2.8 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 7.05-7.10 (1H, *m*, 5'-H), 7.16 (1H, *s*, 7-H), 7.43-7.49 (2H, *m*, 6'- and 7'-H), 8.12 (1H, *d*, *J* = 7.5 Hz, 4'-H), 8.95 (1H, *s*, 4-H), 10.98 (1H, *s*, 1-H), 11.71 (1H, *s*, 1'-H). LR-MS (EI): 489 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₉H₁₃N₃O₃Br₂; 488.9323. *Found*: 488.9320.

5,7-Dibromoindirubin 3'-(*O*-oxiran-2-ylmethyl)oxime (53): Epox/5,7-Br₂-Ind

Prepared by **method IV** with minor modifications. Yield: 78 %, mp. 278 °C (aqueous 1,4-dioxane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.83 (1H, *dd*, *J* = 4.9 and 2.6 Hz, one of oxiran-methylene-H), 2.94 (1H, *t*, *J* = 4.6 Hz, one of oxiran-methylene-H), 3.53-3.58 (1H, *m*, oxiran-methylene-H), 4.62 (1H, *dd*, *J* = 12.5 and 6.8 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 4.91 (1H, *dd*, *J* = 12.5 and 2.8 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 7.11 (1H, *td*, *J* = 6.9 and 2.3 Hz, 5'-H), 7.46-7.55 (2H, *m*, 6'- and 7'-H), 8.15 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, 4'-H), 8.87 (1H, *s*, 4-H), 11.17 (1H, *s*, 1-H), 11.88 (1H, *s*, 1'-H). LR-MS (EI): 489 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₉H₁₃N₃O₃Br₂; 488.9323. *Found*: 488.9325.

5,5'-Dibromoindirubin 3'-(*O*-oxiran-2-ylmethyl)oxime (54): Epox/5,5'-Br₂-Ind

Prepared by **method IV** with minor modifications. Yield: 12 %, mp. 250 °C

(1,4-dioxane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.83 (1H, *dd*, *J* = 5.1 and 2.6 Hz, one of oxiran-methylene-H), 2.94 (1H, *t*, *J* = 4.6 Hz, one of oxiran-methylene-H), 3.54-3.59 (1H, *m*, oxiran-methylene-H), 4.48 (1H, *dd*, *J* = 12.4 and 6.8 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 4.92 (1H, *dd*, *J* = 12.6 and 2.9 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 6.86 (1H, *d*, *J* = 8.3 Hz, 7-H), 7.32 (1H, *dd*, *J* = 8.2 and 2.2 Hz, 6-H), 7.45 (1H, *d*, *J* = 8.3 Hz, 7'-H), 7.65 (1H, *dd*, *J* = 8.6 and 2.0 Hz, 6'-H), 8.25 (1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, 4'-H), 8.81 (1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, 4-H), 10.94 (1H, *s*, 1-H), 11.77 (1H, *s*, 1'-H). LR-MS (EI): 489 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₉H₁₃N₃O₃Br₂; 488.9323. *Found*: 488.9320.

5,6'-Dibromoindirubin 3'-(*O*-oxiran-2-ylmethyl)oxime (55): Epox/5,6'-Br₂-Ind

Prepared by **method IV** with minor modifications. Yield: 18 %, mp. 280 °C (1,4-dioxane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.82 (1H, *dd*, *J* = 5.0 and 2.6 Hz, one of oxiran-methylene-H), 2.94 (1H, *t*, *J* = 4.6 Hz, one of oxiran-methylene-H), 3.52-3.57 (1H, *m*, oxiran-methylene-H), 4.45 (1H, *dd*, *J* = 12.5 and 6.8 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 4.89 (1H, *dd*, *J* = 12.5 and 2.8 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 6.86 (1H, *d*, *J* = 8.3 Hz, 7-H), 7.26 (1H, *dd*, *J* = 8.2 and 1.9 Hz, 5'-H), 7.32 (1H, *dd*, *J* = 8.3 and 2.2 Hz, 6-H), 7.73 (1H, *d*, *J* = 1.7 Hz, 7'-H), 8.05 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, 4'-H), 8.83 (1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, 4-H), 10.95 (1H, *s*, 1-H), 11.75 (1H, *s*, 1'-H). LR-MS (EI): 489 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₉H₁₃N₃O₃Br₂; 488.9323. *Found*: 488.9315.

6,5'-Dibromoindirubin 3'-(*O*-oxiran-2-ylmethyl)oxime (56): Epox/6,5'-Br₂-Ind

Prepared by **method IV** with minor modifications. Yield: 98 %, mp. 291 °C (1,4-dioxane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.80 (1H, *dd*, *J* = 5.1 and 2.6 Hz, one of oxiran-methylene-H), 2.93 (1H, *t*, *J* = 4.8 Hz, one of oxiran-methylene-H), 3.48-3.52 (1H, *m*, oxiran-methylene-H), 4.45 (1H, *dd*, *J* = 12.6 and 6.9 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 4.97 (1H, *dd*, *J* = 12.3 and 2.6 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 7.03 (1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, 7-H), 7.16 (1H, *dd*, *J* = 8.5 and 1.9 Hz, 5-H), 7.44 (1H, *d*, *J* = 8.6 Hz, 7'-H), 7.64 (1H, *dd*, *J* = 8.6 and 2.0 Hz, 6'-H), 8.25 (1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, 4'-H), 8.54 (1H, *d*, *J* = 8.3 Hz, 4-H), 10.93 (1H, *s*, 1-H), 11.72 (1H, *s*, 1'-H). LR-MS (EI): 489 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₉H₁₃N₃O₃Br₂; 488.9323. *Found*: 488.9321.

6,6'-Dibromoindirubin 3'-(*O*-oxiran-2-ylmethyl)oxime (57): Epox/6,6'-Br₂-Ind

Prepared by **method IV** with minor modifications. Yield: 45 %, mp. 274 °C (acetone). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.81 (1H, *dd*, *J* = 5.2 and 2.6 Hz, one of oxiran-methylene-H), 2.92 (1H, *t*, *J* = 4.3 Hz, one of oxiran-methylene-H), 3.46-3.51 (1H, *m*, oxiran-methylene-H), 4.42 (1H, *dd*, *J* = 12.6 and 6.6 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 4.92 (1H, *dd*, *J* = 12.3 and 2.6 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 7.01 (1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, 7-H), 7.15 (1H, *dd*, *J* = 8.3 and 2.0 Hz, 5-H), 7.23 (1H, *dd*, *J* = 8.2 and 1.9 Hz, 5'-H), 7.71 (1H, *d*, *J* = 1.8 Hz, 7'-H), 8.03 (1H, *d*, *J* = 8.3 Hz, 4'-H), 8.54 (1H, *d*, *J* = 8.3 Hz, 4-H), 10.94 (1H, *s*, 1-H), 11.71 (1H, *s*, 1'-H). LR-MS (EI): 489 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₉H₁₃N₃O₃Br₂; 488.9323. *Found*: 488.9330.

7,5'-Dibromoindirubin 3'-(*O*-oxiran-2-ylmethyl)oxime (58): Epox/7,5'-Br₂-Ind

Prepared by **method IV** with minor modifications. Yield: 41 %, mp. 274 °C (1,4-dioxane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.81 (1H, *dd*, *J* = 5.0 and 2.8 Hz, one of oxiran-methylene-H), 2.93 (1H, *t*, *J* = 4.7 Hz, one of oxiran-methylene-H), 3.49-3.53 (1H, *m*, oxiran-methylene-H), 4.46 (1H, *dd*, *J* = 12.6 and 6.6 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 4.97 (1H, *dd*, *J* = 12.5 and 2.7 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 6.96 (1H, *t*, *J* = 8.0 Hz, 5-H), 7.34 (1H, *d*, *J* = 8.3 Hz, 6-H), 7.46 (1H, *d*, *J* = 8.6 Hz, 7'-H), 7.66 (1H, *dd*, *J* = 8.5 and 2.1 Hz, 6'-H), 8.26 (1H, *d*, *J* = 2.1 Hz, 4'-H), 8.63 (1H, *d*, *J* = 7.5 Hz, 4-H), 11.09 (1H, *s*, 1-H), 11.85 (1H, *s*, 1'-H). LR-MS (EI): 489 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₉H₁₃N₃O₃Br₂; 488.9323. *Found*: 488.9320.

7,6'-Dibromoindirubin 3'-(*O*-oxiran-2-ylmethyl)oxime (59): Epox/7,6'-Br₂-Ind

Prepared by **method IV** with minor modifications. Yield: 89 %, mp. 255 °C (1,4-dioxane). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.80 (1H, *dd*, *J* = 5.2 and 2.6 Hz, one of oxiran-methylene-H), 2.92 (1H, *t*, *J* = 4.7 Hz, one of oxiran-methylene-H), 3.47-3.51 (1H, *m*, oxiran-methylene-H), 4.44 (1H, *dd*, *J* = 12.3 and 6.8 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 4.94 (1H, *dd*, *J* = 12.3 and 2.9 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 6.96 (1H, *t*, *J* = 8.0 Hz, 5-H), 7.25 (1H, *dd*, *J* = 8.3 and 1.7 Hz, 5'-H), 7.34 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, 6-H), 7.74 (1H, *d*, *J* = 1.7 Hz, 7'-H), 8.05 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, 4'-H), 8.64 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, 4-H), 11.04 (1H, *s*,

1-H), 11.83 (1H, s, 1'-H). LR-MS (EI): 489 ($[M]^+$). HR-MS (EI): *Calcd for* $C_{19}H_{13}N_3O_3Br_2$; 488.9323. *Found*: 488.9322.

Others

Isatin 3-oxime (8)

Isatin (4) (294 mg, 2.0 mmol) と hydroxylammonium hydrochloride (1.39 g, 20 mmol, 10 molEq) を pyridine (10 mL) 中で加熱還流した。2 時間後、反応溶媒を減圧下留去して得られた粗生成物を、aqueous methanol から再結晶して精製し、isatin 3-oxime (8) 201 mg (Yield: 62 %) を結晶として得た。

mp. 221 °C. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.88 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, 7-H), 7.02 (1H, *td*, *J* = 7.7 and 1.2 Hz, 5-H), 7.35 (1H, *td*, *J* = 7.7 and 1.2 Hz, 6-H), 7.94 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, 4-H), 10.69 (1H, *s*, 1-H), 13.29 (1H, *s*, 3-N-OH). LR-MS (EI): 162 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₈H₆N₂O₂; 162.0429. *Found*: 162.0430.

Isatin 3-(*O*-oxiran-2-ylmethyl)oxime (9): Epox/Isatin

Argon 雰囲気下、isatin 3-oxime (8) (162 mg, 1.0 mmol) を *N,N*-dimethylformamide (super dehydrated) (4 mL) に溶解し、triethylamine (280 μL, 2.0 mmol, 2 molEq) を加えて室温で攪拌した。30 分後、epibromohydrin (815 μL, 10 mmol, 10 molEq) を加えて攪拌を継続した。16 時間後、目的物を ethyl acetate で抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウム, Na₂SO₄ で脱水乾燥してから減圧下溶媒を留去した。得られた粗生成物を ethanol/diethyl ether から再結晶して精製し、isatin 3-(*O*-oxiran-2-ylmethyl)oxime (9) 70 mg (Yield: 32 %) を結晶として得た。

mp. 199 °C. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.71 (1H, *dd*, *J* = 5.2 and 2.6 Hz, one of oxiran-methylene-H), 2.86 (1H, *t*, *J* = 4.9 Hz, one of oxiran-methylene-H), 3.50-3.60 (1H, *m*, oxiran-methylene-H), 4.27 (1H, *dd*, *J* = 12.3 and 6.6 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 4.71 (1H, *dd*, *J* = 12.3 and 2.9 Hz, one of oxiran-CH₂-O), 6.90 (1H, *d*, *J* = 7.8 Hz, 7-H), 7.05 (1H, *td*, *J* = 7.8 and 0.9 Hz, 5-H), 7.41 (1H, *td*, *J* = 7.8 and 1.2 Hz, 6-H), 7.87 (1H, *d*, *J* = 6.9 Hz, 4-H), 10.77 (1H, *s*, 1-H). LR-MS (EI): 218 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₁H₁₀N₂O₃; 218.0691. *Found*: 218.0691.

5,6-Dibromoisatin (20)

Argon 雰囲気下、6-bromoisatin (17) (1.13 g, 5.0 mmol) と *N*-bromosuccinimide (1.78 g, 10 mmol, 2 molEq) を *N,N*-dimethyl formamide (super dehydrated) (18 mL)

に溶解し、室温で攪拌した。19 時間後、目的物を ethyl acetate/methanol で抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウム, Na₂SO₄ で脱水乾燥してから減圧下溶媒を留去した。得られた粗生成物を aqueous 1,4-dioxane から再結晶して精製し、5,6-dibromoisatin (**20**) 992 mg (Yield: 65 %) を結晶として得た。

mp. >300 °C. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.26 (1H, *s*, 7-H), 7.84 (1H, *s*, 4-H), 11.22 (1H, *s*, 1-H). LR-MS (EI): 303 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₈H₃NO₂Br₂; 302.8530. *Found*: 302.8529.

5,7-Dibromoisatin (**21**)

Argon 雰囲気下、7-bromoisatin (**19**) (1.13 g, 5.0 mmol) と *N*-bromosuccinimide (1.78 g, 10 mmol, 2 molEq) を *N,N*-dimethyl formamide (super dehydrated) (18 mL) に溶解し、室温で攪拌した。24 時間後、目的物を ethyl acetate で抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウム, Na₂SO₄ で脱水乾燥してから減圧下溶媒を留去した。得られた粗生成物を aqueous 1,4-dioxane から再結晶して精製し、5,7-dibromoisatin (**19**) 1.35 g (Yield: 89 %) を結晶として得た。

mp. >300 °C. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.68 (1H, *d*, *J* = 1.7 Hz, 4-H), 8.04 (1H, *d*, *J* = 1.7 Hz, 6-H), 11.44 (1H, *s*, 1-H). LR-MS (EI): 303 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₈H₃NO₂Br₂; 302.8530. *Found*: 302.8529.

6-Bromooxindole (**22**)

6-Bromoisatin (2.26 g, 10 mmol) を hydrazine monohydrate (100%) (20 mL) 中で加熱還流した。3 時間後、反応液を放冷し、その後氷冷下に conc. HCl (20 mL) を加えて静置した。析出した結晶を吸引濾取し、濾液と同量の ethanol を加えて析出した過剰の hydrazine hydrochloride を綿栓ろ過して除き、濾液を静置し析出した結晶を吸引濾取した。同様の操作をさらに 4 回繰り返す、得られた粗結晶を合わせて methanol/dichloromethane から再結晶して精製し、6-bromooxindole (**22**) 844 mg (Yield: 40 %) を結晶として得た。

mp. 232 °C. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 3.50 (2H, *s*, 3-H), 6.76 (1H, *d*, *J* = 8.3 Hz, 4-H), 7.33 (1H, *dd*, *J* = 8.3 and 2.1 Hz, 6-H), 7.37 (1H, *d*, *J* = 1.7 Hz, 7-H), 10.48 (1H, *bs*, 1-H). LR-MS (EI): 211 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₈H₆NOBr; 210.9632.

Found: 210.9640.

7-Bromooxindole (23)

7-Bromoisatin (2.26 g, 10 mmol) を hydrazine monohydrate (100%) (20 mL) 中で加熱還流した。3 時間後、反応液を放冷し、その後氷冷下に conc. HCl (20 mL) を加えて静置した。析出した結晶を吸引濾取し、濾液と同量の ethanol を加えて析出した過剰の hydrazine hydrochloride を綿栓ろ過して除き、濾液を静置し析出した結晶を吸引濾取した。同様の操作をさらに 2 回繰り返す、得られた粗結晶を合わせて methanol/dichloromethane から再結晶して精製し、7-bromooxindole (23) 1.65 g (Yield: 78 %) を結晶として得た。

mp. 212 °C. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 3.62 (2H, *s*, 3-H), 6.88 (1H, *t*, *J* = 7.7 Hz, 5-H), 7.20 (1H, *d*, *J* = 7.3 Hz, 6-H), 7.37 (1H, *d*, *J* = 8.1 Hz, 4-H), 11.35 (1H, *bs*, 1-H). LR-MS (EI): 211 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₈H₆NOBr; 210.9632. *Found*: 210.9633.

Indirubin 3'-(*O*-2,3-dihydroxypropyl)oxime (10): E804

Prepared by **method IV** with minor modifications. Yield: 68 %, mp. 252 °C (ethanol). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 3.52 (2H, *t*, *J* = 4.6 Hz, 3'-N-O-CH₂), 3.98-4.04 (1H, *m*, 3'-N-O-CH₂-CH), 4.51 (1H, *dd*, *J* = 10.9 and 6.6 Hz, one of 3'-N-O-CH₂-CH(OH)-CH₂), 4.65 (1H, *dd*, *J* = 10.6 and 4.0 Hz, one of 3'-N-O-CH₂-CH(OH)-CH₂), 4.81 (1H, *t*, *J* = 5.5 Hz, 3'-N-O-CH₂-CH(OH)), 5.12 (1H, *d*, *J* = 4.9 Hz, 3'-N-O-CH₂-CH(OH)-CH₂-OH), 6.90 (1H, *d*, *J* = 7.5 Hz, 7-H), 6.99 (1H, *td*, *J* = 7.1 and 1.2, 6-H), 7.04 (1H, *td*, *J* = 7.0 and 1.4 Hz, 5'-H), 7.15 (1H, *td*, *J* = 7.5 and 1.2 Hz, 5-H), 7.41 (1H, *d*, *J* = 7.5 Hz, 7'-H), 7.43 (1H, *td*, *J* = 7.4 and 1.2 Hz, 6'-H), 8.19 (1H, *d*, *J* = 7.5 Hz, 4'-H), 8.63 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, 4-H), 10.75 (1H, *s*, 1-H), 11.69 (1H, *s*, 1'-H). LR-MS (EI): 351 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₁₉H₁₇N₃O₄; 351.1219. *Found*: 351.1221.

5-Bromoindirubin 3'-(*O*-2,3-dihydroxypropyl)oxime (60)

Prepared by **method IV** with minor modifications. Yield: 71 %, mp. 266 °C (ethanol).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 3.55 (2H, *t*, $J = 5.4$ Hz, 3'-N-O-CH₂), 4.00-4.07 (1H, *m*, 3'-N-O-CH₂-CH), 4.56 (1H, *dd*, $J = 10.7$ and 6.5 Hz, one of 3'-N-O-CH₂-CH(OH)-CH₂), 4.64 (1H, *dd*, $J = 10.7$ and 4.2 Hz, one of 3'-N-O-CH₂-CH(OH)-CH₂), 4.78 (1H, *t*, $J = 5.7$ Hz, 3'-N-O-CH₂-CH(OH)), 5.13 (1H, *d*, $J = 5.0$ Hz, 3'-N-O-CH₂-CH(OH)-CH₂-OH), 6.86 (1H, *d*, $J = 8.0$ Hz, 7-H), 7.05-7.10 (1H, *m*, 5'-H), 7.30 (1H, *dd*, $J = 8.0$ and 1.9 Hz, 7'-H), 7.44-7.48 (2H, *m*, 6- and 6'-H), 8.19 (1H, *d*, $J = 7.6$ Hz, 4'-H), 8.85 (1H, *d*, $J = 1.9$ Hz, 4-H), 10.90 (1H, *s*, 1-H), 11.75 (1H, *s*, 1'-H). HR-MS (ESI): *Calcd for* C₁₉H₁₇N₃O₄Br; 430.0402. *Found*: 430.0406.

Indirubin 3'-(*O*-2-hydroxy-3-(2-hydroxyethylthio)propyl)oxime (7)

Argon 雰囲気下、Epoxy/Ind (3) (208 mg, 0.62 mmol) を *N,N*-dimethyl formamide (super dehydrated) (25 mL) に溶解し、triethylamine (20 mL) および 2-mercapto ethanol (2.5 mL, 36 mmol, 58 molEq) を加えて室温で攪拌した。30 時間後、反応液を ethyl acetate で希釈し、sat. NaCl に conc.HCl を加えて酸性とした後、十分に分液した。有機層を sat. NaHCO₃ で塩基性にした後、中性になるまで H₂O で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウム, Na₂SO₄ で脱水乾燥してから減圧下溶媒を留去した。得られた粗生成物を順次 chloroform/methanol (20:1, v/v%) ならびに chloroform/ethyl acetate (1:1 ~ 1:2, v/v%) を溶出溶媒とする column chromatography に付して精製した。溶出分を減圧下乾燥後、methanol/dichloromethane から再結晶して精製し、indirubin 3'-(*O*-2-hydroxy-3-(2-hydroxyethylthio)propyl)oxime (7) 99.1 mg (Yield: 39 %) を結晶として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 2.66 (2H, *t*, $J = 6.8$ Hz, S-CH₂CH₂OH), 2.73 and 2.78 (each 1H, *dd*, $J = 13.4$ and 6.3 Hz, S-CH₂CH(OH)CH₂-O), 3.53 (2H, *q*, $J = 6.4$ Hz, S-CH₂CH₂OH), 4.10-4.20 (1H, *m*, S-CH₂CH(OH)CH₂-O), 4.55 (1H, *dd*, $J = 11.2$ and 6.6 Hz, one of S-CH₂CH(OH)CH₂-O), 4.66 (1H, *dd*, $J = 11.2$ and 4.0 Hz, one of S-CH₂CH(OH)CH₂-O), 4.82 (1H, *t*, $J = 5.4$ Hz, S-CH₂CH₂OH), 5.43 (1H, *d*, $J = 5.2$ Hz, S-CH₂CH(OH)CH₂-O), 6.91 (1H, *d*, $J = 7.5$ Hz, 7-H), 7.01 (1H, *t*, $J = 7.6$ Hz, 5-H), 7.04 (1H, *td*, $J = 7.4$ and 1.5 Hz, 5'-H), 7.16 (1H, *t*, $J = 7.6$ Hz, 6-H), 7.42 (1H, *d*, $J = 8.0$ Hz, 7'-H), 7.44 (1H, *t*, $J = 7.8$ Hz, 6'-H), 8.18 (1H, *d*, $J = 7.7$ Hz, 4'-H), 8.63 (1H, *d*, $J = 8.1$ Hz, 4-H), 10.79 (1H, *s*, 1-H), 11.71 (1H, *s*, 1'-H). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz,

DMSO-*d*₆ mixed with D₂O) δ : 2.67 (2H, *t*, *J* = 6.8 Hz, S-CH₂CH₂OD), 2.74 and 2.79 (each 1H, *dd*, *J* = 13.5 and 6.3 Hz, S-CH₂CH(OD)CH₂-O), 3.57 (2H, *t*, *J* = 6.9 Hz, S-CH₂CH₂OD), 4.13-4.20 (1H, *m*, S-CH₂CH(OD)CH₂-O), 4.57 (1H, *dd*, *J* = 11.2 and 6.6 Hz, one of S-CH₂CH(OD)CH₂-O), 4.67 (1H, *dd*, *J* = 11.2 and 4.0 Hz, one of S-CH₂CH(OD)CH₂-O), 6.96 (1H, *d*, *J* = 7.8 Hz, 7-H), 7.03 (1H, *td*, *J* = 7.7 and 1.2 Hz, 5-H), 7.07 (1H, *td*, *J* = 7.6 and 0.9 Hz, 5'-H), 7.19 (1H, *td*, *J* = 7.6 Hz, 6-H), 7.37 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, 7'-H), 7.46 (1H, *td*, *J* = 7.6 and 1.1 Hz, 6'-H), 8.19 (1H, *d*, *J* = 7.8 Hz, 4'-H), 8.63 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, 4-H). LR-MS (EI): 411 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₂₁H₂₁N₃O₄S; 411.1253. *Found*: 411.1253.

Indirubin 3'-(*O*-{3-(2-acetoxyethylthio)-2-hydroxypropyl}-1'-acetyl)oxime

Indirubin 3'-(*O*-2-hydroxy-3-(2-hydroxyethylthio)propyl)oxime (**7**) (約 10 mg) を pyridine (1.0 mL) に溶解し、室温で攪拌した。16 時間後、反応液を ethyl acetate で希釈し、sat. NaCl に conc.HCl を加えて酸性とした後、十分に分液した。有機層を sat. NaHCO₃ で塩基性にした後、中性になるまで H₂O で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウム, Na₂SO₄ で脱水乾燥してから減圧下溶媒を留去した。得られた粗生成物を順次 *n*-hexane/ethyl acetate (2:1, v/v%) を溶出溶媒とする column chromatography に付して精製し、indirubin 3'-(*O*-{3-(2-acetoxyethylthio)-2-hydroxypropyl}-1'-acetyl)oxime を結晶として得た。

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ : 1.98 and 1.99 (each 3H, *s*, each CH₃COO-), 2.81 and 2.84 (each 1H, *dt*, *J* = 13.8 and 6.6 Hz, S-CH₂CH₂OCOCH₃), 2.88 (1H, *dd*, *J* = 14.3 and 7.2 Hz, one of S-CH₂CH(OCOCH₃)CH₂O-), 3.02 (1H, *dd*, *J* = 14.3 and 5.7 Hz, one of S-CH₂CH(OCOCH₃)CH₂O-) 4.16 (2H, *t*, *J* = 6.6 Hz, S-CH₂CH₂OCOCH₃), 4.74 (1H, *dd*, *J* = 12.0 and 6.6 Hz, one of S-CH₂CH(OCOCH₃)CH₂O-), 4.81 (1H, *dd*, *J* = 12.0 and 3.5 Hz, one of S-CH₂CH(OCOCH₃)CH₂O-), 5.40-5.47 (1H, *m*, S-CH₂CH(OCOCH₃)CH₂O-), 6.91 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, 7-H), 7.01 (1H, *td*, *J* = 7.4 and 1.1 Hz, 5-H), 7.04 (1H, *td*, *J* = 7.7 and 1.4 Hz, 5'-H), 7.17 (1H, *td*, *J* = 7.7 and 1.1 Hz, 6-H), 7.42 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, 7'-H), 7.45 (1H, *td*, *J* = 8.0 and 1.1 Hz, 6'-H), 8.08 (1H, *d*, *J* = 7.5 Hz, 4'-H), 8.61 (1H, *d*, *J* = 7.7 Hz, 4-H), 10.81 (1H, *s*, 1'-H).

¹H-NMR (500 MHz, Chloroform-*d* mixed with methanol-*d*₄) δ : 2.05 and 2.06 (each 3H,

s, each CH₃COO-), 2.85 (2H, *td*, *J* = 6.9 and 1.1 Hz, S-CH₂CH₂OCOCH₃), 2.90 (1H, *dd*, *J* = 14.1 and 6.0 Hz, one of S-CH₂CH(OCOCH₃)CH₂O-), 2.95 (1H, *dd*, *J* = 14.1 and 6.9 Hz, one of S-CH₂CH(OCOCH₃)CH₂O-) 4.25 (2H, *t*, *J* = 6.7 Hz, S-CH₂CH₂OCOCH₃), 4.81 (1H, *dd*, *J* = 12.0 and 5.7 Hz, one of S-CH₂CH(OCOCH₃)CH₂O-), 4.87 (1H, *dd*, *J* = 12.0 and 4.0 Hz, one of S-CH₂CH(OCOCH₃)CH₂O-), 5.43-5.49 (1H, *m*, S-CH₂CH(OCOCH₃)CH₂O-), 6.95 (1H, *d*, *J* = 7.4 Hz, 7-H), 7.01 (1H, *d*, *J* = 7.4 Hz, 7'-H), 7.03 (1H, *t*, *J* = 7.8 Hz, 5-H), 7.12 (1H, *td*, *J* = 7.4 and 0.9 Hz, 5'-H), 7.20 (1H, *td*, *J* = 7.4 and 1.1 Hz, 6-H), 7.39 (1H, *td*, *J* = 7.7 and 1.1 Hz, 6'-H), 8.15 (1H, *d*, *J* = 7.4 Hz, 4'-H), 8.67 (1H, *d*, *J* = 7.8 Hz, 4-H), 11.56 (1H, *s*, 1'-H). LR-MS (EI): 495 ([M]⁺). HR-MS (EI): *Calcd for* C₂₅H₂₅N₃O₆S; 495.1464. *Found*: 495.1464.

Comprehension assignment of the chemical shifts of protons in the aromatic ring

| Br | 4-H | | | 5-H | | | 6-H | | | 7-H | | | 4'-H | | | 5'-H | | | 6'-H | | | 7'-H | | |
|----------------------|------|-------|------|-----------|-------|------|-----------|-----------|-----------|------|-------|------|------|-------|------|-----------|-----------|-----------|------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | Ind | Indox | Epox | Ind | Indox | Epox | Ind | Indox | Epox | Ind | Indox | Epox | Ind | Indox | Epox | Ind | Indox | Epox | Ind | Indox | Epox | Ind | Indox | Epox |
| - | 8.77 | 8.66 | 8.63 | 7.00-7.05 | 6.97 | 7.00 | 7.26 | 7.15 | 7.16 | 6.91 | 6.92 | 6.90 | 7.66 | 8.24 | 8.16 | 7.00-7.05 | 7.01-7.07 | 7.05 | 7.58 | 7.44-7.79 | 7.45 | 7.43 | 7.44-7.49 | 7.43 |
| 5-Br | 8.91 | 8.76 | 8.84 | - | | | 7.36-7.42 | 7.38-7.46 | 7.43-7.51 | 6.85 | 6.84 | 6.86 | 7.64 | 8.25 | 8.16 | 7.03 | 7.06 | 7.08 | 7.57 | 7.38-7.46 | 7.43-7.51 | 7.36-7.42 | 7.27 | 7.31 |
| 6-Br | 8.68 | 8.56 | 8.56 | 7.21 | 7.09 | 7.31 | - | | | 7.05 | 7.03 | 7.03 | 7.65 | 8.23 | 8.16 | 7.03 | 7.05 | 7.07 | 7.59 | 7.38-7.46 | 7.43-7.49 | 7.42 | 7.38-7.46 | 7.43-7.49 |
| 7-Br | 8.77 | 8.68 | 8.65 | 6.99 | 6.90 | 6.96 | 7.44 | 7.37-7.47 | 7.33 | - | | | 7.67 | 8.25 | 8.16 | 7.05 | 7.06 | 7.05-7.11 | 7.60 | 7.37-7.47 | 7.44-7.50 | 7.43 | 7.28 | 7.44-7.50 |
| 5'-Br | 8.75 | 8.63 | 8.60 | 7.03 | 6.94 | 7.00 | 7.27 | 7.13 | 7.17 | 6.90 | 6.89 | 6.90 | 7.78 | 8.36 | 8.26 | - | | | 7.73 | 7.56 | 7.63 | 7.41 | 7.40 | 7.43 |
| 6'-Br | 8.76 | 8.64 | 8.62 | 7.02 | 6.95 | 7.00 | 7.27 | 7.13 | 7.17 | 6.90 | 6.89 | 6.90 | 7.73 | 8.14 | 8.06 | 7.19 | 7.18 | 7.22 | - | | | 7.68 | 7.68 | 7.71 |
| 5,6-Br ₂ | 9.03 | 8.90 | 8.95 | - | | | - | | | 7.17 | 7.18 | 7.16 | 7.63 | 8.24 | 8.12 | 7.04 | 7.07 | 7.05-7.11 | 7.58 | 7.43 | 7.43-7.49 | 7.41 | 7.46 | 7.43-7.49 |
| 5,7-Br ₂ | - | 8.80 | 8.87 | - | | | - | 7.47-7.51 | 7.46-7.55 | - | | | - | 8.25 | 8.15 | - | 7.10 | 7.11 | - | 7.43 | 7.46-7.55 | - | 7.47-7.51 | 7.46-7.55 |
| 5,5'-Br ₂ | 8.91 | 8.75 | 8.81 | - | | | 7.43 | 7.29 | 7.32 | 6.87 | 6.84 | 6.86 | 7.79 | 8.35 | 8.25 | - | | | 7.75 | 7.60 | 7.65 | 7.41 | 7.44 | 7.45 |
| 5,6'-Br ₂ | 8.93 | 8.76 | 8.83 | - | | | 7.43 | 7.28 | 7.32 | 7.05 | 6.85 | 6.86 | 7.60 | 8.16 | 8.05 | 7.22 | 7.22 | 7.26 | - | | | 7.68 | 7.71 | 7.73 |
| 6,5'-Br ₂ | 8.65 | 8.53 | 8.54 | 7.22 | 7.10 | 7.16 | - | | | 7.05 | 7.03 | 7.03 | 7.78 | 8.32 | 8.25 | - | | | 7.74 | 7.59 | 7.64 | 7.40 | 7.42 | 7.44 |
| 6,6'-Br ₂ | 8.67 | 8.55 | 8.54 | 7.21 | 7.10 | 7.15 | - | | | 7.05 | 7.03 | 7.01 | 7.58 | 8.13 | 8.03 | 7.21 | 7.22 | 7.23 | - | | | 7.68 | 7.70 | 7.71 |
| 7,5'-Br ₂ | 8.73 | 8.62 | 8.63 | 6.98 | 6.89 | 6.96 | 7.35-7.48 | 7.30 | 7.34 | - | | | 7.77 | 8.32 | 8.26 | - | | | 7.73 | 7.58 | 7.66 | 7.35-7.48 | 7.42 | 7.46 |
| 7,6'-Br ₂ | 8.76 | 8.62 | 8.64 | 6.99 | 6.88 | 6.96 | 7.45 | 7.29 | 7.34 | - | | | 7.59 | 8.10 | 8.05 | 7.22 | 7.19 | 7.25 | - | | | 7.69 | 7.69 | 7.74 |

Bioassay

Materials

Human hepatocellular carcinoma (HepG2 cell) は Cellular Engineering Technologies 社のものを用いた。Dulbecco's modified Eagle's medium, Penicillin-Streptomycin, Fetal bovine serum, Trypsin-EDTA solution は、Sigma-Aldrich 社のものを用いた。AlamarBlue[®] reagent はコスモ・バイオ社のものを用いた。Dimethylsulfoxide (for Biochemistry), acetonitrile (for HPLC), trifluoroacetic acid (Wako special grade), 塩化ナトリウム (Wako special grade), 塩化カリウム (Wako special grade), リン酸水素二ナトリウム (Wako special grade) は和光純薬工業社のものを用いた。リン酸二水素カリウム (Extra pure reagent), リン酸水素二カリウム (Extra pure reagent) は Nacalai tesque 社のものを用いた。

Phosphate buffered saline (PBS) は、NaCl (16 g), KCl (0.4 g), Na₂HPO₄ · 12H₂O (5.8 g), KH₂PO₄ (0.4 g) を ultra pure water (> 18.2 MΩ) (200 mL) に溶解したものを 10 倍 PBS 溶液を保存溶液とし、用時 ultra pure water で 10 倍希釈したものを濾過滅菌して用いた。

50 mM Kpi buffer (pH 7.4) は、KH₂PO₄ (10.89 g) / ultra pure water (200 mL) と、K₂HPO₄ (73.02 g) / ultra pure water (800 mL) をあわせてリン酸で pH を調節した 400 mM Kpi buffer (pH 7.4) を、ultra pure water で 8 倍希釈したものの pH を再度調節して用いた。

Cell viability assay: alamarBlue[®] assay

Preparation

HepG2 細胞の培養には、Dulbecco's modified Eagle's medium (450 mL) 中に、PS (10 mL; Penicillin 100,000 units and Streptomycin 100 mg) および fetal bovine serum (50 mL) を加えたものを培地として用いた (以下 DMEM)。調製後冷蔵 (4 °C) 保存し、使用時には 35 °C に加温して用いた。調製してから 1 ヶ月を限度として破棄した。

被験試薬溶液は、cryovial[®]に被験試薬を約 1 mg 秤取して DMSO に溶解した 10 mM stock solution を調製し、用時希釈して用いた。10 mM stock は調製後冷凍

(-20 °C) 保存し、1 ヶ月を限度として破棄し再度調製して用いた。Cell viability assay においては、常温にした 10 mM stock solution (10 µL) を DMEM (990 µL) で希釈して 100 µM 溶液とし、100 µM 溶液を別途調製した 1% DMSO 含有 DMEM を用いて希釈することで、各濃度の被験試薬溶液を調製した。

AlamarBlue® assay

Trypsin 処理して回収し、DMEM に懸濁した HepG2 を、DMEM で適宜希釈して 1.0×10^4 cells/100 µL とし、96 well microplate に分注 (100 µL/well)、pre-incubate (飽湿条件下 37 °C, 5.0 % CO₂, 24 h) した。培地を吸引除去し、被験物質を含む DMEM (0.01-100 µM, 100 µL/well, $n = 4-6$) を添加して incubate (飽湿条件下 37 °C, 5.0% CO₂, 24 or 72 h) した。培地を吸引除去した後に PBS で洗浄して (100 µL/well)、DMEM で 10 倍希釈した alamarBlue® reagent を添加 (100 µL/well)、incubate (飽湿条件下 37 °C, 5.0 % CO₂, 3-5 h) した。AlamarBlue® reagent の発色を目視で確認した後、励起波長 577 nm、検出波長 612 nm における蛍光強度を測定した (FLUOstar OPTIMA)。被験物質を含まない DMEM を添加した well を control、HepG2 細胞を含まない well に control と同様の処理を施した well を background として、control の蛍光強度を 100%としたときの被験物質添加 well の蛍光強度から細胞生存率を算出した。

Hydrolysis assay

Preparation

HepG2 細胞を petri-dish (60 cm², 60-70% confluent) 8 枚分用意し、1 枚ごとに培地吸引後に PBS で洗浄し、DMEM (2 mL) を添加して cell scraper で細胞を剥離した。細胞溶液を遠心 (4 °C, 1000 rpm, 5 min) し上清を除去した後、氷冷下に、50 mM Kpi buffer (pH 7.4) (2 mL) に懸濁して超音波処理したものを cell lysate とした。

被験試薬は、前出の 10 mM stock solution (20 µL) を用時 ethanol (180 µL) で希釈して、1 mM 溶液として用いた。

Incubation

ガラス製試験管に cell lysate または 50 mM Kpi buffer (pH 7.4) (200 μ L) と被験試薬 (10 μ L) を入れ振盪 (37 $^{\circ}$ C, 250 rpm, 1 h) した。10% Methanol 含有 ethyl acetate (400 μ L) を加えて、vortex-mix (20 sec)、sonication (60 sec)、遠心 (4 $^{\circ}$ C, 1000 rpm, 5 min) の順に処理をして得た上清の一部 (100 μ L) を HPLC 用 vial に分取し、減圧下溶媒を留去した (有機溶媒抽出画分)。有機溶媒抽出画分は 0.05% TFA 含有 acetonitrile (300 μ L) に溶解し、その一部 (50 μ L) を HPLC に inject した。50 mM Kpi buffer (pH 7.4) と共に振盪したときの被験試薬由来の peak 面積を 100% とし、cell lysate で処理した被験試薬由来の peak 面積をもとに加水分解率を算出した。また、同様の方法で調製した有機溶媒抽出画分を UPLC/MS に付して分子量測定を行った。

HPLC and UPLC-MS apparatus

HPLC

HPLC 測定は、Shimadzu Prominence (送液ユニット; LC-20AD, オートサンプラー; SIL-20A, 検出器; SPD-20A and RF-10AXL, オープン; CTO-20A, オンラインデガッサ; DGU-20A, システムコントローラー; CBM-20A) に、Shiseido Capcell pak C18 MG III (250 x 4.6 mm) を接続して使用した。移動相 (CH₃CN:acidified (0.10% TFA) H₂O = 8:2, v/v%) は、流速 1.0 mL/min. に設定した。分析温度は 40 $^{\circ}$ C で行った。

UPLC-MS

UPLC-MS 測定は、Waters Xevo G2-S QToF に、Waters AQUITY 1.7 μ m UPLC BEH C18 (130 \AA , 2.1 x 50 mm) を接続して使用した。移動相 (CH₃CN:acidified (0.10% TFA) H₂O = 8:2, v/v%) は、流速 0.1 mL/min. に設定した。分析温度は 40 $^{\circ}$ C で行った。

参考文献

Original article

Y. Ichimaru, H. Saito, T. Uchiyama, K. Metori, K. Tabata, T. Suzuki and S. Miyairi, “Indirubin 3’-(*O*-oxiran-2-ylmethyl)oxime: A novel anticancer agent”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 25, no. 7, pp. 1403-1406, 2015.

Reference

- [1] G. I. Evan and K. H. Vousden, “Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer”, *Nature*, vol. 411, no. 6835, pp. 342-348.
- [2] P. J. Roberts and C. J. Der, “Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer”, *Oncogene*, vol. 26, no. 22, pp. 3291-3310, 2007.
- [3] G. Selvaggi, S. Novello, V. Torri, E. Leonardo, P. De Giuli, P. Borasio, C. Mossetti, F. Ardisson, P. Lausi and G. V. Scagliotti, “Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer”, *Annals of Oncology*, vol. 15, no. 1, pp. 28-32, 2004.
- [4] K. Matsumoto, S. Hashimoto, Y. Gon, T. Nakayama and T. Horie, “Proinflammatory cytokine – induced and chemical mediator – induced IL-8 expression in human bronchial epithelial cells through p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway”, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 101, no. 6, pp. 825-831, 1998.
- [5] B. A. Hemming, T. J. Resink and P. Cohen, “Reconstitution of Mg-ATP-dependent protein phosphatase and its activation through a phosphorylation mechanism”, *FEBS Letters*, vol. 150, no. 2, pp. 319-324, 1982.
- [6] D. C. Fry, S. A. Kuby and A. S. Mildvan, “ATP-binding site of adenylate kinase: Mechanistic implications of its homology with *ras*-encoded p21, F₁-ATPase, and other nucleotide-binding proteins”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. vol. 83, no. 4, pp. 907-911, 1986.

- [7] J. Zhang, P. L. Yang and N. S. Gray, "Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors", *Nature review cancer*, vol. 9, no. 1, pp. 28-39, 2009.
- [8] Y.-J. Liu, C.-M. Zhang and Z.-P. Liu, "Recent developments of small molecule EGFR inhibitors based on the quinazoline core scaffolds", *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, vol. 12, no. 4, pp. 391-406, 2012.
- [9] C.-H. Yun, T. J. Boggon, Y. Li, M. S. Woo, H. Greulich, M. Meyerson and M. J. Eck, "Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: Mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity", *Cancer Cell*, vol. 11, no. 3, pp. 217-227, 2007.
- [10] D. Li, L. Ambrogio, T. Shimamura, S. Kubo, M. Takahashi, L. R. Chirieac, R. F. Padera, G. I. Shapiro, A. Baum, F. Himmelsbach, W. J. Rettig, M. Meyerson, F. Solca, H. Greulich and K.-K. Wong, "BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models", *Oncogene*, vol. 27, no. 34, pp. 4702-4711, 2008.
- [11] F. Solca, G. Dahl, A. Zoephel, G. Bader, M. Sanderson, C. Klein, O. Kraemer, F. Himmelsbach, E. Haaksma and G. R. Adolf, "Target binding properties and cellular activity of afatinib (BIBW2992), an irreversible ErbB family blocker", *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 343, no. 2, pp. 342-350, 2012.
- [12] V. M. Raney, T. M. Harris and M. P. Stone, "DNA conformation mediates aflatoxin B₁-DNA binding and the formation of guanine N⁷ adducts by aflatoxin B₁ 8,9-*exo*-epoxide", *Chemical Research in Toxicology*, vol. 6, no. 1, pp. 64-68, 1993.
- [13] I. Giri, M. D. Jenkins, N. C. Schnetz-Boutaud and M. P. Stone, "Structural refinement of the 8,9-dihydro-8-(N⁷-guanyl)-9-hydroxy-aflatoxin B₁ adduct in a 5'-Cp^{AFB}G-3'- sequence", *Chemical Research in Toxicology*, vol. 15, no. 5, pp. 638-647, 2002.
- [14] R. Hoessel, S. Leclerc, J. A. Endicott, M. E. Nobel, A. Lawrie, P. Tunnah, M. Leost, E. Damiens, D. Marie, D. Marko, E. Niederberger, W. Tang, G. Eisenbrand and L. Meijer, "Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia

- medicine, inhibits cyclin-dependent kinases”, *Nature Cell Biology*, vol. 1, no. 1, pp. 60-67, 1999.
- [15] S. Leclerc, M. Garnier, R. Hoessel, D. Marko, J. A. Bibb, G. L. Synder, P. Greengard, J. Biernat, Y.-Z. Wu, E.-M. Mandelkow, G. Eisenbrand and Laurent Meijer, “Indirubin inhibit glycogen synthase kinase-3 β and CDK5/P25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer’s disease”, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 1, pp. 251-260, 2001.
- [16] M. Knockaert, P. Greengard and L. Meijer, “Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases”, *TRENDS in Pharmacological Science*, vol. 23, no. 9, pp. 417-425, 2002.
- [17] L. Meijer, M. Flajolet and P. Greengard, “Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3”, *TRENDS in Pharmacological Science*, vol. 25, no. 9, pp. 471-480, 2004.
- [18] B. Lee and G. A. McArthur, “CDK4 inhibitors an emerging strategy for the treatment of melanoma”, *Future Medicine*, vol. 2, no. 3, pp. 255-266, 2015.
- [19] A. Dickey, S. Schleicher, K. Leahy, R. Hu, D. Hallahan and D. K. Thotala, “GSK-3 β inhibition promotes cell death, apoptosis, and in vivo tumor growth delay in neuroblastoma Neuro-2A cell line”, *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 104, no. 1, pp. 145-153, 2011.
- [20] K. Pal, Y. Cao, I. N. Gaisina, S. Bhattacharya, S. K. Dutta, E. Wang, H. Gunosewoyo, A. P. Kozikowski, D. D. Billadeau and D. Mukhopadhyay, “Inhibition of GSK-3 induces differentiation and impaired glucose metabolism in renal cancer”, *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 13, no. 2, pp. 285-296, 2014.
- [21] L. Meijer, A.-L. Skaltsounis, P. Magiatis, P. Polychronopoulos, M. Knockaert, M. Leost, X. P. Ryan, C. A. Vonica, A. Brivanlou, R. Dajani, C. Crovace, C. Tarricone, A. Musachio, S. M. Roe, L. Pearl, P. Greengard, “GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins”, *Chemistry & Biology*, vol. 10, no. 12, pp. 1255-1266, 2003.
- [22] S.-J. Choi, J.-E. Lee, S.-Y. Jeong, I. Im, S.-D. Lee, E.-J. Lee, S. K. Lee, S.-M. Kwon, S.-G. Ahn, J.-H. Yoon, S.-Y. Han, J.-I. Kim and Y.-C. Kim,

- “5,5’-Substituted indirubin 3’-oxime derivatives as potent cyclin-dependent kinase inhibitors with anticancer activity”, *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 53, no. 9, pp. 3696-3706, 2010.
- [23] V. Myrianthopoulos, M. Kritsanida, N. Gaboriaud-Kolar, P. Magiatis, Y. Ferandin, E. Durieu, O. Lozach, D. Cappel, M. Soundarajan, P. Filppakopoulos, W. Sherman, S. Knapp, L. Meijer, E. Mikros and A.-L. Skaltsounis, “Novel inverse binding mode of indirubin derivatives yields improved selectivity for DYRK kinases”, *ACS Medicinal Chemistry Letters*, vol. 4, no. 1, pp. 22-26, 2013.
- [24] K. Vougianniopoulou, Y. Ferandin, K. Bettayeb, V. Myrianthopoulos, O. Lozach, Y. Fan, C. H. Johnson, P. Magiatis, A.-L. Skaltsounis, E. Mikros and L. Meijer, “Soluble 3’,6-substituted indirubins with enhanced selectivity toward glycogen synthase kinase-3 alter circadian period”, *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 51, no. 20, pp. 6421-6431, 2008.
- [25] J. Adachi, Y. Mori, S. Matsui, H. Takigami, J. Fujino, H. Kitagawa, C. A. Miller III, T. Kato, K. Saeki and T. Matsuda, “Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine”, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 34, pp. 31475-31478, 2001.
- [26] A. Puga, C. Ma and J. L. Marlowe, “The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathway”, *Biochemical Pharmacology*, vol. 77, no. 4, pp. 713-22, 2009.
- [27] C. Esser, A. Rannug and B. Stockinger, “The aryl hydrocarbon receptor in immunity”, *Trends in Immunology*, vol. 30, no. 9, pp. 447-454, 2009.
- [28] T. Force, D. S. Krause and R. A. Van Etten, “Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition”, *Nature Reviews Cancer*, vol. 7, no. 5, pp. 332-344, 2007.
- [29] J. M. Domínguez, A. Fuertes, L. Orozco, M. del Monte-Millán, E. Delgado and M. Medina, “Evidence for irreversible inhibition of glycogen synthase kinase-3 β by Tideglusib”, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 2, pp. 893-904, 2012.
- [30] L. Meijer, A.-L. Skaltsounis, P. Magiatis, P. Polychronopoulos, M. Knockaert, M.

- Leost, X. P. Ryan, C. A. Vonica, A. Brivanlou, R. Dajani, C. Crovace, C. Tarricone, A. Musacchio, S. M. Roe, L. Pearl and P. Greengard, "GSK-3 selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins", *Chemistry & Biology*, vol. 10, no. 12, pp. 1255-1266, 2000.
- [31] J. D. Blethrow, J. S. Glavy, D. O. Morgan and K. M. Shokat, "Covalent capture of kinase-specific phosphopeptides reveals CDK1-cyclin B substrates", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 5, pp. 1442-1447, 2008.
- [32] B. O. Odii and P. Coussons, "Pharmacological isolation of experimental methods of drug-resistant hepatocellular carcinoma cell line", *Journal of Cancer Therapy*, vol. 3, no. 4, pp. 216-221, 2012.
- [33] S. Nam, R. Buettner, J. Turkson, D. Kim, J. Q. Cheng, S. Muehlbeyer, F. Hippe, S. Vatter, K.-H. Merz, G. Eisenbrand and R. Jove, "Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 17, pp. 5998-6003, 2005.
- [34] S. Nam, A. Scuto, F. Yang, W. Y. Chen, S. Park, H.-S. Yoo, H. Konig, R. Bhatia, X. Cheng, K.-H. Merz, G. Eisenbrand, R. Jove, "Indirubin derivatives induce apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells involving inhibition of Stat5 signaling", *Molecular Oncology*, vol. 6, no. 3, pp. 276-283, 2012.
- [35] Y.-K. Chan, H.-H. Kwok, L.-S. Chan, K. S.-Y. Leung, J. Shi, N.-K. Mak, R. N.-S. Wong and P. Y.-K. Yue, "An indirubin derivative, E804, exhibits potent angiostatic activity", *Biochemical Pharmacology*, vol. 83, no. 5, pp. 598-607, 2011.
- [36] K. Vougianniopoulou and A.-L. Skaltsounis, "From Tyrian purple to kinase modulators: Naturally halogenated indirubins and synthetic analogues", *Planta Medica*, vol. 78, no. 14, pp. 1515-1528, 2012.
- [37] A. Beauchard, Y. Ferandin, S. Frère, O. Lozach, M. Blairvacq, L. Meijer, V. Thiéry and T. Besson, "Synthesis of novel 5-substituted indirubins as protein kinases inhibitors", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 14, no. 18, pp.

6434-6443, 2006.

- [38] P. Polychronopoulos, P. Magiatis, A.-L. Skaltsounis, V. Myrianthopoulos, E. Mikros, A. Tarricone, A. Musacchio, S. M. Roe, L. Pearl, M. Leost, P. Greengard and L. Meijer, "Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases", *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 47, no. 4, pp. 935-946, 2004.
- [39] J. Ribas, K. Bettayab, Y. Ferandin, M. Knockaert, X. Garrofé-Ochoa, F. Totzke, C. Schächtele, J. Mester, P. Polychronopoulos, P. Magiatis, A.-L. Skaltsounis, J. Boix and L. Meijer, "7-Bromoindirubin 3'-oxime induces caspase-independent cell death", *Oncogene*, vol. 25, no. 47, pp. 6304-6318, 2006.
- [40] P. D. Popp, "The chemistry of isatin", *Advances in Heterocyclic Chemistry*, vol. 18, pp. 1-58, 1975.
- [41] S. Bartoli, A. Cipollone, A. Squarcia, A. Madami, D. Fattori, "Electrophilic bromination of *meta*-substituted anilines with *N*-bromosuccinimide: Regioselectivity and solvent effect", *Synthesis*, vol. 78, no. 8, pp. 1305-1308, 2009.