

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①① N° de publication : **2 801 216**

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **99 14749**

⑤① Int Cl<sup>7</sup> : **A 61 K 31/404**, A 61 P 9/00, 13/12, 17/06, 25/28, 25/  
18, 31/04, 31/12, 35/00

①②

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

**A1**

②② Date de dépôt : 23.11.99.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 25.05.01 Bulletin 01/21.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *CENTRE NATIONAL DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS Etablissement  
public à caractère scientifique et technologique — FR.*

⑦② Inventeur(s) : MEIJER LAURENT, EISENBRAND  
GERHARD, HOESSEL RALPH et THOMMET  
ANDREA.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : ARMENGAUD AINE.

⑤④ UTILISATION DE DERIVES D'INDIRUBINE POUR LA FABRICATION DE MEDICAMENTS.

⑤⑦ L'invention vise l'utilisation pour la fabrication de mé-  
dicaments inhibiteurs de la GSK-3 $\beta$  de dérivés d'indirubine.  
Application pour le traitement de pathologies impliquant  
GSK-3 $\beta$  et CDK5.

**FR 2 801 216 - A1**



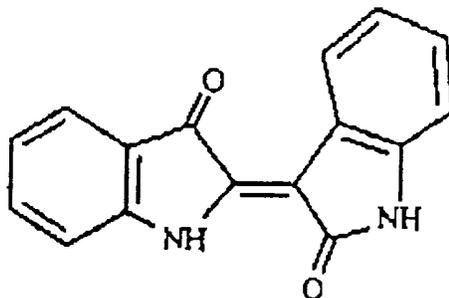
Utilisation de dérivés d'indirubine pour la fabrication de médicaments.

5

L'invention a pour objet une nouvelle utilisation en thérapeutique de dérivés d'indirubine.

L'indirubine appartient à la famille des indigoïdes. Le terme indigoïde est utilisé comme nom  
10 générique des colorants du groupe de l'indigo. Il s'agit de bis-indoles, dérivés de diverses sources naturelles par fermentation, oxydation et dimérisation en présence de lumière.

L'indirubine (ou isoindigotine), répond à la  
15 formule A :



Elle constitue le principe actif du Danggui Longhui Wan, utilisé en médecine traditionnelle chinoise dans le traitement de maladies chroniques, comme les  
20 leucémies.

Dans la demande EP 98 109 854.2, dans laquelle certains des inventeurs de la demande sont co-inventeurs, on rapporte que des dérivés d'indigoïdes, parmi lesquels l'indirubine et ses dérivés, sont des inhibiteurs puissants  
25 des kinases cycline-dépendantes (CDKs en abrégé), avec des IC<sub>50</sub> (dose inhibitrice à 50%) de 50 à 200 nM (voir également Hoessel et al., Nature Cell Biology, vol 1, n°1, mai 1999). Ces kinases sont des régulateurs clés du cycle cellulaire.

Les inhibiteurs entrent en compétition avec l'ATP pour se lier à la sous-unité catalytique de la kinase.

Ces propriétés inhibitrices de CDKs, qui entraînent un arrêt du cycle cellulaire, confèrent à ces dérivés d'indigoïdes un intérêt pour le traitement de pathologies liées à la perte du contrôle de la prolifération comme les cancers, le psoriasis, les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses, la néphrologie, les maladies neurodégénératives et les infections virales.

De manière surprenante, les inventeurs ont à présent mis en évidence que, parmi ces dérivés d'indigoïdes, seuls les dérivés d'indirubine exerçaient en outre un effet inhibiteur sur une autre cible enzymatique, constituée par la glycogène synthase kinase-3 $\beta$  ou GSK-3 $\beta$  en abrégé.

Cette kinase est un élément essentiel de la voie de signaux WNT. Elle est impliquée dans de multiples processus physiologiques: régulation du cycle cellulaire par contrôle de taux de cycline D1 et de  $\beta$ -caténine, formation dorso-ventrale durant le développement, action de l'insuline sur la synthèse de glycogène, excroissance axonale, neurotoxicité de HIV-1 à médiation par Tat, et autres.

De plus, on sait que la GSK-3 $\beta$  et la CDK5 sont responsables pour une bonne part de l'hyperphosphorylation anormale de la protéine tau liant les microtubules comme observé dans les filaments appariés en hélice dans la maladie d'Alzheimer.

On mesure également l'intérêt de pouvoir disposer de dérivés inhibiteurs de l'activité de GSK-3 $\beta$  pour favoriser la division cellulaire.

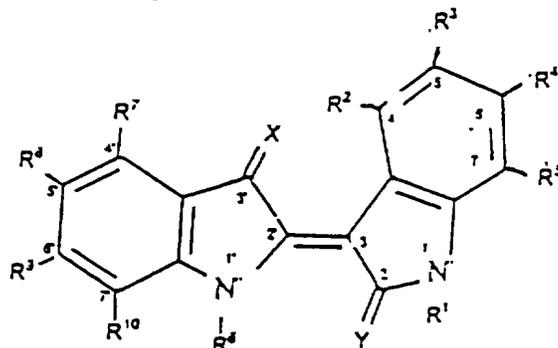
Or, les seuls inhibiteurs de la GSK-3 $\beta$  connus à ce jour sont constitués par le lithium et certains dérivés de purine.

La sélectivité du lithium n'a pas été rapportée, mais étant donné la nature atomique du produit, il est vraisemblable qu'elle doit être très faible. De plus, le lithium n'agit qu'à des doses considérables (IC<sub>50</sub> autour de 10 mM).

Il en est de même avec les dérivés de purine décrits dans la demande WO 98/16528, qui sont peu sélectifs et dont les IC<sub>50</sub> sont autour de 10 µM.

L'invention apporte une solution à ces problèmes avec l'utilisation d'indirubines de grande efficacité avec des IC<sub>50</sub> inférieures à 10 µM, et le plus généralement de l'ordre de 5 à 50 nM, pour la fabrication de médicaments inhibiteurs de GSK-3β.

Conformément à l'invention, pour la fabrication desdits médicaments, on utilise des dérivés d'indirubine répondant à la formule générale I :



dans laquelle R<sup>1</sup> et R<sup>6</sup>, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un atome d'halogène; un groupe hydroxy; un groupe méthylènehydroxy; un radical alcoyle ou alkyloxy ou méthylènealkoxy, à chaîne droite ou ramifiée, en C1 à C18; un radical cycloalkyle ayant 3 à 7 atomes de carbone, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un radical aryle, aralkyle ou aryloxy, substitué ou non substitué, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe mono-, di- ou trialkylsilyle ayant 1 à 6 de carbone, indépendamment l'un de l'autre, dans chaque cas, dans le groupe alkyle à chaîne droite ou ramifiée; un groupe mono-, di- ou

triarylsilyle, avec des groupes aryle substitués ou non, indépendamment l'un de l'autre, dans chaque cas; un groupe trifluorométhyle; un groupe -COM; -COOM; ou -CH<sub>2</sub>COOM, avec M représentant un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en C1 à C18, à chaîne droite ou ramifiée, substituée le cas échéant par un ou plusieurs groupes hydroxy et/ou amino, ou un groupe aryle comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes, pouvant être substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, radicaux alkyle ou groupe alcoxy; un groupe

-NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, dans lequel R<sup>11</sup> et R<sup>12</sup>, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un radical alkyle à chaîne droite ou ramifiée, en C1 à C18, le cas échéant substitué en outre par un ou plusieurs groupes hydroxy et/ou amino, un groupe aryle, substitué ou non, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe acyle; un groupe méthylèneamino -CH<sub>2</sub>-NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, dans lequel R<sup>11</sup> et R<sup>12</sup> présentent les significations ci-dessus; un groupe benzyle, dans lequel le noyau benzène comprend, le cas échéant, un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe méthylèncycloalkyle avec 3 à 7 atomes de carbone, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un résidu d'acide aminé physiologique lié à l'azote, comme un amide; un O-glycoside ou un N-glycoside, dans lequel le glycoside est choisi parmi les monosaccharides ou les disaccharides; ou un groupe méthylènesulfonate; R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> et R<sup>10</sup>, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène; d'halogène; un groupe hydroxy; un groupe nitroso; un groupe nitro; un groupe alkoxy; un groupe alkyle à chaîne droite ou ramifiée, en C1 à C18, le cas échéant substitué par un ou plusieurs groupes hydroxy et/ou amino; un groupe aryle, substitué ou non, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe aralkyle, substitué ou non, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe aryloxy, substitué ou non comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un

groupe méthylènearyloxy, substitué ou non, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe cycloalkyle, avec 3 à 7 atomes de carbone, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe méthylènecycloalkyle, avec 3 à 7 atomes de carbone, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe trifluorométhyle; un groupe -COM; -COOM; ou CH<sub>2</sub>COOM, avec M représentant un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en C1 à C18, à chaîne droite ou ramifiée, substituée le cas échéant en outre par un ou plusieurs groupes hydroxy et/ou amino, ou un groupe aryle comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes, pouvant être substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, groupes alkyle ou groupes alcoxy ; un groupe -NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, dans lequel R<sup>11</sup> et R<sup>12</sup>, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un radical alkyle à chaîne droite ou ramifiée, en C1 à C18, le cas échéant substitué en outre par un ou plusieurs groupes hydroxy et/ou amino, un groupe aryle substitué ou non, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes, un groupe acyle, ou dans lequel l'atome d'azote fait partie d'un groupe cycloalkyle ayant 3 à 7 atomes de carbone, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe -CONR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, dans lequel R<sup>11</sup> et R<sup>12</sup> présentent les significations ci-dessus; un groupe hydroxylamino; un groupe phosphate; un groupe phosphonate; un groupe sulfate; un groupe sulfonate; un groupe sulfonamide; un groupe -SO<sub>2</sub>NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, dans lequel R<sup>11</sup> et R<sup>12</sup> présentent les significations données ci-dessus; un groupe azo -N=N-R<sup>13</sup>, dans lequel R<sup>13</sup> représente un groupe aromatique, le cas échéant substitué par un ou plusieurs groupes carboxyle, phosphoryle ou sulfonate, ou un groupe O-glycoside ou N-glycoside, dans lequel le glycoside est choisi parmi les monosaccharides ou les dissacharides; ou R<sup>1</sup> et R<sup>5</sup>, et R<sup>6</sup> et R<sup>10</sup>, respectivement, forment ensemble, indépendamment l'un de l'autre, un cycle ayant 1 à 4 groupes CH<sub>2</sub>, le cas échéant substitué; et X et Y,

identiques ou différents, représentent un atome d'oxygène; de soufre; de sélénium; de tellurium; un groupe  $-NR^{14}$ , dans lequel  $R^{14}$  représente un atome d'hydrogène, un groupe alkyle, à chaîne droite ou ramifiée, en C1 à C18, le cas échéant substitué par un ou plusieurs groupes carboxyle, phosphoryle ou sulfonate, un groupe aryle substitué ou non, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes, un groupe aralkyle, ou un groupe sulfonate; ou  $-NOR^{14}$ , dans lequel le groupe  $R^{14}$  présente les significations données ci-dessus, et les sels de ces dérivés physiologiquement acceptables.

Dans une disposition de l'invention, un ou plusieurs atomes d'un ou plusieurs cycles benzéniques sont remplacés par des atomes d'azote.

Dans une autre disposition, un ou plusieurs systèmes cycliques aromatiques ou non aromatiques, qui comprennent, le cas échéant, un ou plusieurs hétéroatomes indépendamment l'un de l'autre, sont condensés au système indirubine.

Dans encore une autre disposition, les dérivés d'indirubine de formule (I) sont liés à un ester de polyéthylèneglycol ou à un éther de polyéthylèneglycol par des liaisons, respectivement, ester ou éther.

L'invention vise plus spécialement les dérivés d'indirubine possédant une  $IC_{50}$  vis-à-vis de GSK-3 $\beta$  inférieure à 10  $\mu$ M et de préférence à 1  $\mu$ M, et notamment ceux avec une  $IC_{50}$  inférieure à 50 nM.

De manière préférée, dans de tels dérivés, X et Y, identiques ou différents, représentent un groupe = O ou = NOH.

Dans les familles correspondantes, les substituants  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  et  $R^8$  présentent avantageusement les significations suivantes:

- R<sup>3</sup>: un atome d'hydrogène, d'halogène, un radical alkyle, un groupe -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>-N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>-N-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>-OH, -SO<sub>2</sub>-N-(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>-OH)<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>-NH-CH<sub>3</sub>,

- R<sup>4</sup> et R<sup>3</sup>, indépendamment l'un de l'autre : un  
5 atome d'hydrogène ou d'halogène,

- R<sup>1</sup>: un radical alkyle ou aryle, les autres substituants donnés sur la formule (I) représentant un atome d'hydrogène.

Dans une famille préférée selon l'invention,  
10 X = Y, ces deux substituants représentant un groupe = O.

Des dérivés de cette famille constituant des inhibiteurs de GSK-3β de grande efficacité, avec des IC<sub>50</sub> inférieures à 5 μM, le plus généralement à 1 μM, voire à 50 nM, comprennent avantageusement des substituants R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>  
15 et R<sup>8</sup> répondant aux significations suivantes :

- R<sup>1</sup>: alkyle, notamment méthyle, et phényle,

- R<sup>3</sup>: hydrogène, halogène (F, Cl, Br, I), NO<sub>2</sub>,  
- SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>-N-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>-OH, -SO<sub>2</sub>-N-(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>-OH)<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>-NHCH<sub>3</sub>,

20 -R<sup>4</sup> et R<sup>8</sup>: halogène, en particulier I ou Br, les autres substituants donnés dans la formule (I) représentant un atome d'hydrogène.

Des dérivés particulièrement préférés sont choisis parmi l'indirubine, la 5-iodo-indirubine, la 5-bromo-indirubine, la 5-chloro-indirubine, la 5-fluoro-indirubine, la 5-méthyl-indirubine, la 5-nitro-indirubine, la 5-SO<sub>3</sub>H-indirubine, la 5'-bromo-indirubine, la 5-5'-dibromo-indirubine ou l'acide 5'-bromo-indirubine 5-sulfonique.

30 Dans une autre famille préférée selon l'invention, X représente un groupe = NOH et Y un groupe = O.

Dans un groupe préféré de cette famille, R<sup>3</sup> représente un atome d'halogène, notamment I, ou un groupe  
35 -SO<sub>3</sub>Na.

Les dérivés correspondants présentent avantageusement une  $IC_{50}$  vis-à-vis de GSK-3 $\beta$  inférieure à 100 nM, et même pour nombre d'entre eux inférieure à 50 nM.

Des dérivés préférés de ce groupe sont choisis  
5 parmi l'indirubine-3'-monoxime, la 5-iodo-indirubine-3'-monoxime et la 5-SO<sub>3</sub>Na-indirubine-3'-monoxime.

Comme indiqué plus haut, les dérivés définis ci-dessus, ont déjà été décrits comme inhibiteurs des CDKs, ainsi que d'autres indigoïdes dérivés par exemple de  
10 l'indigo ou de l'isoindigo. Or de manière surprenante, seuls les dérivés d'indirubine exercent en outre un effet inhibiteur vis-à-vis de GSK-3 $\beta$ .

Cet effet est le plus généralement du même ordre de grandeur vis-à-vis des CDKs et de la GSK-3 $\beta$ .

15 Les médicaments fabriqués conformément à l'invention en utilisant les dérivés d'indirubine définis ci-dessus sont utilisables pour le traitement des pathologies dans lesquelles la GSK-3 $\beta$  est impliquée.

Il en est ainsi par exemple des diabètes, où les  
20 inhibiteurs de GSK-3 $\beta$  sont utilisables comme insulino-mimétiques. On rappelle que l'insuline agit par une cascade d'évènements biochimiques conduisant à une inhibition de la GSK-3 $\beta$  et que cette inhibition est responsable de la réponse des cellules à l'insuline.

25 De même, ces médicaments présentent un grand intérêt pour le traitement de maladies neurodégénératives. Comme démontré dans les exemples, l'hyperphosphorylation de la protéine tau provoquée par CDK5 et GSK-3 $\beta$  peut être en effet inhibée par les dérivés d'indirubine. En administrant  
30 les médicaments fabriqués selon l'invention, il est alors possible, grâce à leur effet inhibiteur à la fois de CDK5 et de GSK-3 $\beta$ , d'empêcher l'hyperphosphorylation de la protéine tau chez les malades d'Alzheimer et de lutter contre la neurodégénérescence.

Ces médicaments trouvent également une application de grand intérêt pour le traitement de maladies maniaco-dépressives.

On citera également leur utilisation pour le traitement de cancers où leur effet inhibiteur à la fois de GSK-3 $\beta$  et de CDK5, qui se traduit par l'apoptose de la cellule tumorale, est avantageusement mis à profit.

Ces médicaments s'avèrent également efficaces pour le traitement de maladies provoquées par des parasites unicellulaires comme la malaria, les trypanosomes, les leishmanias, les toxoplasmes, les pneumocystis et autres, ou des parasites pluricellulaires, comme les champignons et les vers.

Lors de l'élaboration des médicaments, les principes actifs, utilisés en quantités thérapeutiquement efficaces, sont mélangés avec les véhicules pharmaceutiquement acceptables pour le mode d'administration choisi.

Ainsi pour une administration par voie orale, les médicaments sont préparés sous forme de gélules, comprimés, dragées, capsules, pilules, gouttes et analogues. De tels médicaments peuvent renfermer de 1 à 100 mg de principe actif par unité.

Pour l'administration par voie injectable (intraveineuse, sous-cutanée, intramusculaire), les médicaments se présentent sous forme de solutions stériles ou stérilisables. Les doses par unité de prise peuvent varier de 1 à 50 mg de principe actif. La posologie quotidienne est choisie de manière à obtenir une concentration finale d'au plus 100  $\mu$ M en dérivé d'indirubine dans le sang du patient traité.

Afin d'illustrer l'invention, sans toutefois en limiter sa portée, on rapporte dans les exemples qui suivent d'autres caractéristiques et avantages.

Dans ces exemples, il sera fait référence aux figures 1 à 3, qui représentent respectivement,

- les figures 1A à 1C, les effets inhibiteurs d'indirubines utilisées selon l'invention vis-à-vis de GSK-3 $\beta$ , CDK5/p25 et CDK1/cycline B,
- la figure 2, l'effet compétiteur avec ATP pour la fixation à GSK-3 $\beta$ , et
- la figure 3, l'effet inhibiteur par les indirubines, *in vitro*, de la phosphorylation de tau par GSK-3 $\beta$ .

#### 10 . Caractérisation des indirubines

Les analyses élémentaires ont été effectuées à l'aide d'un appareil d'analyse élémentaire de CHN Perkin-Elmer 2400. Les spectres de RMN<sup>1</sup>H ont été enregistrés à 400 MHz, de RMN <sup>13</sup>C à 100 MHz sur un appareil Bruker AMX 400, avec comme référence interne du tétraméthylsilane. s désigne un singulet, d, un doublet et m, un multiplet. Les spectres de masse ont été pris selon le mode d'ions positifs sous impact électronique (EI 70) et avec un appareil Finigan MAT 90.

20

#### . Exemples de synthèses d'indirubines

##### indirubine

L'indirubine est préparée selon Russell et al, J.Am.Chem.Soc.1969,91,3851-3859 (méthode modifiée) en utilisant 1,76 g (12,0 mmole) d'isatine et 2,00 g (11,4 mmole) d'indoxylacétate. Après filtration, le résidu est lavé 2 fois avec du méthanol, et plusieurs fois avec de l'eau froide, jusqu'à neutralité du filtrat. Le produit est séché sur KOH. On obtient 2,42 g (81,0%) de cristaux violet sombre  $R_f = 0,64$  (acétate d'éthyle hexane 1/1 v/v); PF 341-343 °C : <sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  6,91 (d,  $J = 8,1$ , C7H), 7,02 (m, C5H et C5'H), 7,26 (m, C6H), 7,42 (d,  $J = 8,1$ , C7'H), 7,58 (m C6'H), 7,66 (d,  $J = C4'H$ ), 8,77 (d,  $J = 7,7$ , C4H), 11,01 (s) et 10,88 (s) (N1H et N1'H); <sup>13</sup>C-RMN (DMSO -d<sub>6</sub>,

90°C)  $\delta$  106,97 (s, C3), 109,57 (d,  $J = 162,2$ , C7), 113,15 (d,  $J = 168,7$ , C7'), 119,37 (s, C3a'), 121,21 (d,  $J = 162,1$ , Hz) et 121,19 (d,  $J = 162,1$  Hz) (C5 et C5'), 121,58 (s, C3a), 124,62 (d,  $J = 164,6$ , Hz) et 124,20 (d,  $J = 163,8$ , Hz) (C6 et C4'), 129,15 (d,  $J = 159,8$ , C4), 136,85 (d,  $J = 161,4$ , C6'), 138,48 (s, C7a), 141,07 (s, C7a'), 152,35 (s, C2'), 171,11 (s, C2), 188,27 (s, C3'); MS  $m/e$  262 ( $M^+$ , 100), 234 (43), 205 (25), 131 (4). Anal. ( $C_{16}H_{10}N_2O_2$ ) C, H, N.

#### 10 5-iodoindirubine

On procède comme décrit pour l'indirubine. En partant de 655 mg de 5-iodoisatine (2,40 mmole) et de 399 mg d'indoxyacétate (2,28 mmole, la réaction conduit à 720 mg de produit brut. Par recristallisation à partir d'éthanol, on obtient 58 mg (6,2 %) de cristaux violet sombre ;  $R_f = 0,68$  (acétate d'éthyle/hexane 1/1 v/v); PF 334-335 °C :  $^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6,75 (d,  $J = 8,1$ , C7H), 7,04 (m, C5'H), 7,42 (d,  $J = 8,1$ , C7'H), 7,57 (m, C6H et C6'H), 7,65 (d,  $J = 7,5$ , C4'H), 9,11 (s, C4H), 11,00 (s) et 11,09 (s) (N1H et N1'H);  $^{13}C$ -RMN (DMSO - $d_6$ , 90°C)  $\delta$  83,73 (d,  $J = 16,9$ , C5), 105,18 (s, C3), 111,85 (d,  $J = 164,6$ , C7), 113,43 (d,  $J = 167,2$ , C7'), 119,27 (s, C3a'), 121,65 (d,  $J = 163,6$ , C5'), 124,03 (s, C3a), 124,44 (d,  $J = 163,9$ , Hz, C4'), 132,49 (d,  $J = 171,2$ , C6), 137,00 (d,  $J = 166,9$ , Hz) et 137,15 (d,  $J = 160,1$  Hz) (C4 et C6'), 139,26 (s, C7a'), 140,44 (s, C7a), 152,41 (s, C2'), 170,48 (s, C2), 188,54 (s, C3') ; MS  $m/e$  388 ( $M^+$ , 100), 360 (3), 261 (6), 233 (16), 205 (16). Anal. ( $C_{16}H_9IN_2O_2$ ) C, H, N.

#### 5-bromoindirubine

30 On procède comme décrit pour l'indirubine. En partant de 1,30 g de 5-bromoisatine (5,75 mmole) et de 1,00 g d'indoxyacétate (5,71 mmole), le produit brut est recristallisé à partir de pyridine et conduit à 1,16 g (59,3 %) de cristaux noirs avec une nuance violette;  $R_f =$

0,49 (acétate d'éthyle hexane 1/1 v/v) :  $^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6,86 (d,  $J = 8,4$ , C7H), 7,05 (pt, C5'H), 7,41-7,31 (m, C6H et C7'H), 7,59 (m, C6'H), 7,66 (d,  $J = 7,5$ , C4'H), 8,94 (s, C4H), 11,10 (s) et 11,00 (s) (N1H et N1'H);  $^{13}\text{C-RMN}$  (DMSO -  
 5  $d_6$ ,  $90^\circ\text{C}$ )  $\delta$  104,92 (s, C3), 111,24 (d,  $J = 165,1$ , C7), 112,89 (s, C5), 113,53 (d,  $J = 167,8$ , C7'), 118,92 (s, C3a'), 121,64 (d,  $J = 164,4$ , C5'), 123,41 (s, C3a), 124,49 (d,  $J = 164,0$ , C4'), 126,60 (d,  $J = 171,3$ , C6), 131,03 (d,  $J = 167,1$ , C4), 137,29 (d,  $J = 160,9$ , C6'), 139,16  
 10 (s, C7a'), 139,74 (s, C7a), 152,42 (s, C2'), 170,50 (s, C2), 188,77 (s, C3'); MS  $m/e$  342 ( $M^+$ , 100), 340 ( $M^+$ , 100) 314 (18), 312 (18), 261 (7). Anal. ( $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{BrN}_2\text{O}_2$ ) C, H, N.

#### 5-chloroindirubine

On opère comme décrit pour l'indirubine. En partant de 500  
 15 mg de 5-chloroisatine (2,75 mmole) et de 480 mg d'indoxylacétate (2,73 mmole), on obtient 766 mg (94,6 %) d'une poudre violette,  $R_f = 0,60$  (acétate d'éthyle /hexane 1/1 v/v) :  $^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6,89 (d,  $J = 8,3$ , C7H), 7,04 (m, C5'H), 7,27 (d,  $J = 8,3$ , C6'H), 7,42 (d,  $J = 7,8$ , C7'H),  
 20 7,58 (m, C6'H), 7,65 (d,  $J = 7,6$ , C4'H), 8,78 (s, C4H), 10,99 (s) et 11,09 (s) (N1H et N1'H);  $^{13}\text{C-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  104,95 (s, C3), 110,61 (d,  $J = 164,6$ , C7), 113,50 (d,  $J = 168,6$ , C7'), 118,85 (s, C3a'), 121,54 (d,  $J = 165,4$ , C5'), 122,85 (s, C3a), 123,76 (d,  $J = 170,2$  Hz) et 124,41 (d,  $J =$   
 25 163,8 Hz) (C6 et C4'), 125,00 (s, C5), 128,16 (d,  $J = 167,0$ , C4), 137,21 (d,  $J = 159,8$ , C6'), 139,10 (s) et 139,31 (s) (C7a et C7a'), 152,39 (s, C2'), 170,52 (s, C2), 188,72 (s, C3') ; MS  $m/e$  296 ( $M^+$ , 100), 268 (39), 233 (35), 205 (50) . Anal. ( $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{O}_2$ ) C, H, N.

#### 30 5-fluoroirindirubine

On procède comme décrit pour l'indirubine. En partant de 500 mg de 5-fluoroisatine (3,03 mmole) et de 530 mg d'indoxylacétate (3,00 mmole), on obtient 776 mg (92,4 %) d'une poudre violette,  $R_f = 0,32$  (acétate d'éthyle/

hexane 1/2 v/v):  $^1\text{H}$ -RMN (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6,87 (dd,  $J_{\text{H,H}} = 8,3$ ,  $J_{\text{H,H}} = 4,7$  C7H), 7,10-7,01 (m, C6H et C5'H), 7,42 (d,  $J = 8,2$ , C7'H), 7,58 (pt, C6'H), 7,65 (d,  $J = 7,4$ , C4'H), 8,56 (d,  $J_{\text{F,H}} = 10,6$ , C4H), 11,00 (b, N1H et N1'H) ;  $^{13}\text{C}$ -RMN (DMSO- $d_6$ )

5  $\delta$  105,93 (s, C3), 110,13 (dd,  $J_{\text{C,H}} = 163,5$ ,  $J_{\text{C,F}} = 8,7$ , C7), 111,34 (dd,  $J_{\text{C,H}} = 169,3$ ,  $J_{\text{C,F}} = 27,6$ , C6), 113,57 (d,  $J = 162,0$ , C7'), 115,24 (dd,  $J_{\text{C,H}} = 188,9$ ,  $J_{\text{C,F}} = 24,7$ , C4) 118,98 (s, C3a'), 121,64 (d,  $J = 164,2$ , C5'), 122,41 (d,  $J_{\text{C,F}} = 10,8$ , C3a), 124,56 (d,  $J = 163,5$ , C4'), 137,31 (s, C7a)

10 137,36 (d,  $J = 162,8$ , C6'), 139,12 (s, C7a') 152,60 (s, C2'), 157,40 (d,  $J_{\text{C,F}} = 233,2$ , C5), 171,02 (s, C2), 188,96 (s, C3') ; MS  $m/e$  280 ( $\text{M}^+$ , 100), 252 (73), 223 (32). Anal. ( $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{FN}_2\text{O}_2$ ) C, H, N.

15 5-méthylindirubine

On opère comme décrit pour l'indirubine. En partant de 500 mg de 5-méthylisatine (3,10 mmole) et 540 mg d'indoxylacétate (3,07 mmole), on obtient 781 mg (92,0 %) d'une poudre violette,  $R_f = 0,44$  (acétate d'éthyle/hexane

20 1/2 v/v):  $^1\text{H}$ -RMN (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  2,33 (s,  $\text{CH}_3$ ), 7,08-7,0 (m, C6H et C5'H), 6,79 (d,  $J = 7,9$ , C7H), 7,42 (d,  $J = 7,9$ , C7'H), 7,58 (pt, C6'H), 7,64 (d,  $J = 7,6$ , C4'H), 8,63 (s, C4H), 10,79 (s) et 11,00 (s) (N1H et N1'H);  $^{13}\text{C}$ -RMN (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  20,99 (q,  $J = 126,5$ ,  $\text{CH}_3$ ), 106,79 (s, C3), 109,17 (d,  $J =$

25 161,3, C7), 113,33 (d,  $J = 168,5$ , C7'), 119,94 (s, C3a'), 121,09 (d,  $J = 164,4$  C5') 121,45 (s, C3a), 124,19 (d,  $J = 163,7$ , C4'), 125,11 (d,  $J = 164,4$ , C6), 129,72 (d,  $J = 157,4$ , C4), 129,72 (s, C5) 136,96 (d,  $J = 161,6$ , C6'), 138,08 (s) et 138,65 (s) (C7a et C7a'), 152,38 (s, C2'),

30 171,93 (s, C2), 188,49 (s, C3') ; MS  $m/e$  276 ( $\text{M}^+$ , 100), 261 (10), 248 (47), 247 (53). Anal. ( $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ ) C, H, N.

5-nitroindirubine

On procède comme décrit pour l'indirubine. En partant de 1,00 g de 5-nitroisatine (5,20 mmole) et 900 mg

d'indoxyiacétate (5,14 mmole), on obtient 1,39 g (88,2 %) d'une poudre violette,  $R_f = 0,16$  (d'éthyle acétate/hexane  $\frac{1}{2}$  v/v):  $^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,01 (d,  $J = 8,7$ , C7H), 7,05 (pt, C5'H), 7,40 (d,  $J = 8,1$ , C7'), 7,58 (pt, C6'H), 7,64 (d,  $J = 7,5$ , C4'H), 8,13 (d,  $J = 8,7$ , C6H), 9,60 (s, C4H), 11,15 (s) et 11,49 (s) (N1H et N1'H);  $^{13}\text{C-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  103,51 (s, C3), 109,27 (d,  $J = 167,8$ , C7), 113,68 (d,  $J = 167,8$ , C7'), 118,83 (s, C3a'), 119,48 (d,  $J = 167,8$ , C6) 121,59 (s, C3a), 121,97 (d,  $J = 163,0$ , C5'), 124,60 (d) et 124,69 (d) (C4 et C4'), 137,37 (d,  $J = 161,6$ , C6'), 139,97 (s, C5) 136,96 (d,  $J = 161,6$ , C6'), 138, (s) et 138,65 (s, C7a'), 141,63 (s, C5), 145,71 (s, C7a), 152,38 (s, C2'), 170,93 (s, C2), 188,78 (s, C3') ; MS  $m/e$  307 ( $M^+$ , 100), 276 (10), 262 (100), 234 (23). Anal. ( $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_4$ ) C, H, N.

15 acide indirubine-5-sulfonique (sel de sodium)

On opère comme décrit pour l'indirubine. En partant de 250 mg du sel de sodium dihydraté de l'acide isatine-5-sulfonique (1,00 mmole) et de 170 mg d'indoxyiacétate (0,971 mmole), on obtient 258 mg (70,8 %) d'un solide violet,  $R_f = 0,73$  (éthanol):  $^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6,84 (d,  $J = 8,0$ , C7H), 7,04 (m, C5'H), 7,43 (d,  $J = 8,0$ , C7'H), 7,54-7,61 (m, C4'H et C6'H), 7,67 (d,  $J = 7,4$ , C6H), 9,13 (s, C4H), 10,99 (s) et 11,05 (s) (N1H et N1'H);  $^{13}\text{C-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  106,25 (s, C3), 108,20 (d,  $J = 163,3$ , C7), 113,39 (d,  $J = 168,6$ , C7'), 120,50 (s) et 118,98 (s) (C3a et C3a'), 121,28 (d,  $J = 157,9$ , C5') 122,57 (d,  $J = 169,4$ , C6), 124,27 (d,  $J = 165,6$ , C4'), 126,83 (d,  $J = 163,3$ , C4), 137,02 (d,  $J = 161,0$ , C6'), 138,45 (s, C5), 140,89 (s) et 141,64 (s) (C7a et C7a'), 152,39 (s, C2'), 171,14 (s, C2), 188,33 (s, C3'). Anal. ( $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{N}_2\text{NaO}_5\text{S} \cdot 1,5 \text{H}_2\text{O}$ ) C, H, N.

5'-bromoindirubine

On opère comme décrit pour l'indirubine. En partant de 59 mg d'isatine (0,40 mmole) et de 100 mg de 5-bromo-

indoxylacétate (0,394 mmole), on obtient 123 mg (92,6 %) d'une poudre violette,  $R_f = 0,59$  (acétate d'éthyle/hexane 1/1 v/v):  $^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6,89 (d,  $J = 7,8$ , C7H), 7,02 (pt, C5H), 7,26 (pt, C6H), 7,39 (d,  $J = 8,5$ , C7'H), 7,71 (d,  $J = 8,5$ , C6'H), 7,76 (s, C4'H), 8,73 (d,  $J = 7,8$ , C4H), 10,89 (s) et 11,08 (s) (N1H et N1'H);  $^{13}\text{C-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  107,43 (s, C3), 109,54 (d,  $J = 161,4$ , C7), 112,63 (s, C5'), 115,49 (d,  $J = 169,4$ , C7'), 120,64 (s) et 121,20 (s) (C3a et C3a'), 121,20 (d,  $J = 160,0$  C5) 124,69 (d,  $J = 154,5$ , C6), 126,31 (d,  $J = 163,0$ , C4'), 129,56 (d,  $J = 159,0$ , C4), 137,69 (s, C7a') 138,87 (d,  $J = 166,1$ , C6'), 141,05 (s, C7a), 151,23 (s, C2'), 170,64 (s, C2), 187,15 (s, C3'); MS m/e 342 ( $M^+$ , 100), 340 ( $M^+$ , 100), 314 (16), 312 (16), 261 (1), 233 (44). Anal. ( $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{BrN}_2\text{O}_2$ ) H, N, C: calc, 56,3; trouvé, 55,7.

#### 5,5'-dibromoindirubine

On procède comme décrit pour l'indirubine. En partant de 89 mg de 5-bromoisatine (0,39 mmole) et de 100 mg de 5-bromoindoxylacétate (0,394 mmole), on obtient 154 mg (94,0 %) d'une poudre violette:  $^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6,84 (d,  $J = 8,1$ , C7H), 7,42-7,36 (m, C6H et C7'H), 7,71 (d,  $J = 8,5$ , C6'H), 7,76 (s, C4'H), 8,88 (s, C4H), 11,01 (s) et 11,16 (s) (N1H et N1'H); MS m/e 422 ( $M^+$ , 47), 420 ( $M^+$ , 100), 418 ( $M^+$ , 48), 394 (3), 392 (7), 390 (3), 342 (25), 340 (25), 313 (15), 311 (15). Anal. ( $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_2$ ) C, H, N.

#### acide 5'-bromoindirubine-5-sulfonique (sel de sodium)

On procède comme décrit pour l'indirubine. En partant de 224 mg de sel de sodium dihydraté de l'acide isatine-5-sulfonique (0,787 mmole) et de 190 mg de 5-bromoindoxylacétate (0,748 mmole), on obtient 204 mg (56,9 %) d'une poudre violette:  $^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6,82 (d,  $J = 8,0$ , C7H), 7,40 (d,  $J = 8,5$ , C7'H), 7,55 (d,  $J = 8,0$ , C6H), 7,73 (d,  $J = 8,5$ , C6'H), 7,79 (s, C4'H), 9,09 (s, C4H), 11,11

(b, N1H et N1'H). Anal. ( $C_{16}H_9Br_2N_3NaO_5S_3H_2O$ ) H, N, C: calc, 40,1 ; trouvé 39,6.

indirubine-3'-monoxime

On prépare ce composé comme décrit Farbwerke vorm. Meister  
 5 Lucius & Brüning in Hoechst a.M. Verfahren zur Herstellung  
 von Derivaten der Indirubine. DRP 283726. Le produit brut  
 est recristallisé à partir d'éthanol/eau (7/2, v/v). On  
 obtient le composé recherché sous forme de cristaux rouge  
 sombre,  $R_f = 0,55$  (acétate d'éthyle/hexane 1/1 v/v):  $^1H$ -RMN  
 10 (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6,90 (d,  $J = 7,9$ , C7H), 7,42 (d,  $J = 7,9$ ,  
 C7'H), 7,58 (pt, C6'H), 7,64 (d,  $J = 7,6$ , C7H), 6,95 (m,  
 C5H), 7,03 (m,, C5'H), 7,13 (m, C6H), 7,41 (m, C6'H et  
 C7'H), 8,24 (d,  $J = 7,2$ , C4H), 8,65 (d,  $J = 7,2$ , C4H) 10,72  
 (s) et 11,73 (s) (N1H et N1'H), 13,48 (s, NOH) ;  $^{13}C$ -RMN  
 15 (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  98,88 (s, C3), 108,91 (d,  $J = 162,3$ , C7),  
 111,52 (d,  $J = 165,8$ , C7'), 116,54 (s, C3a'), 120,43 (d,  
 160,2, C5'), 121,49 (d,  $J = 161,6$  C5) 122,66 (s, C3a),  
 123,09 (d,  $J = 165,1$ , C6), 125,92 (d,  $J = 154,0$ , C4),  
 127,95 (d,  $J = 164,4$ , C4'), 132,02 (d,  $J = 159,5$ , C6'),  
 20 138,34 (s, C7a), 144,83 (s, C7a'), 145,32 (s, C2'), 151,22  
 (s, C3'), 170,95 (s, C2) ; MS m/e 277 ( $M^+$ , 100 %), 260 (87  
 %), 247 (24 %), 220 (14 %), 205 (11). Anal. ( $C_{16}H_{11}N_3O_2$  0,25  
 $H_2O$ ) C, H, N.

5-iodoindirubine-3'-oxime

25 On opère comme décrit pour l'indirubine-3'-monoxime. En  
 partant de 250 mg d'indirubine-3'-monoxime (0,644 mmole) et  
 de 175 mg de chlorhydrate d'hydroxylamine (2,52 mmole) dans  
 7,5 ml de pyridine, on obtient un précipité. Le produit  
 brut est lavé avec de l'eau et recristallisé à partir  
 30 d'éthanol. On obtient 119 mg (45,9 %) de cristaux rouge,  $R_f$   
 = 8,50 (d'acétate éthyle/hexane 1/1 v/v):  $^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ )  
 6,73 (d,  $J = 6,7$ , C7H), 7,09-7,01 (m, C5'H), 7,44-7,40 (m,  
 C6, C6'H, et C7'H), 8,26 (d,  $J = 7,6$ , C4'H), 8,90 (s, C4H),  
 10,79 (s) et 11,88 (s) (N1H et N1'H), 13,68 (s, NOH);  $^{13}C$ -

RMN (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  83,69 (s, C5), 96,59 (s, C3), 110,89 (d, C7), 111,51 (d, C7'), 116,44 (s, C3a'), 121,77 (d, C5') 125,40 (s, C3a), 127,42 (d, C4'), 130,00 (d, C6), 131,52 (d, C6'), 133,40 (d, C4), 137,20 (s, C7a), 144,01 (s, C7a'),  
 5 146,68 (s, C2'), 151,52 (s, C3'), 170,25 (s, C2); MS m/e 403 (M<sup>+</sup>, 100), 387 (9), 373 (10), 276 (5), 260 (46). Anal. (C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) C, H, N.

#### 6-iodoindirubine

On opère comme décrit pour l'indirubine. En partant de 250  
 10 mg de 6-iodoisatine (0,92 mmole) et de 120 mg d'indoxylacétate (0,69 mmole), on obtient 182 mg (68,0 %) d'une poudre violette, R<sub>f</sub> = 0,47 (acétate d'éthyle/hexane 1/1 v/v): <sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7,01 (pt, J = 7,5, C5'H), 7,19 (s, C7H), 7,38 (m, C5H et C7'H), 7,56 (pt, J = 7,3, C6'H),  
 15 7,62 (d, J = 7,6, C4'H), 8,49 (d, J = 8,3, C4H), 10,93 (s) et 11,03 (s) (N1H et N1'H); <sup>13</sup>C-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  94,60 (d, J = 10,4, C6), 105,57 (s, C3), 113,71 (d, J = 169,5, C7'), 118,05 (d, J = 167,1, C4'), 119,17 (s, C3a'), 121,24 (s, C3a), 121,65 (d, J = 163,4, C7), 124,56  
 20 (d, J = 163,4, C5'), 126,17 (d, J = 167,1, C4), 129,99 (d, J = 167,5, C5), 137,29 (d, J = 161,0, C6'), 139,07 (s, C7a'), 142,12 (s, C7a), 152,56 (s, C2'), 170,70 (s, C2), 188,83 (s, C3'); MS m/e 388 (M<sup>+</sup>, 100), 360 (9), 261 (15), 233 (53), 205 (53), 127 (2). Anal. (C<sub>16</sub>H<sub>9</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) H, N, C :  
 25 calc, 49,5 %; trouvé 48,5 %.

#### 1-méthylindirubine

On procède comme décrit pour l'indirubine. En partant de 200 mg de 1-méthylisatine (1,24 mmole) et 217 mg d'indoxylacétate (1,24 mmole), le produit brut est  
 30 recristallisé à partir de pyridine et sublimé (140°C, sous vide), on obtient 195 mg (56,9 %) de billes claires légèrement violettes violettes; R<sub>f</sub> = 0,88 (acétate d'éthyle/hexane 3/2 v/v): <sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  3,29 (s, CH<sub>3</sub>), 7,02-7,12 (m, C5H, C7H, et C5'H), 7,35 (pt, C6H), 7,43 (d, J

= 8,3, C7'H), 7,59 (pt, C6'H), 7,67 (d,  $J = 7,6$ , C4'H), 8,81 (d,  $J = 7,3$ , C4H), 11,07 (s, N1'H) ; MS  $m/e$  276 ( $M^+$ , 100), 248 (25), 247 (54). Anal. ( $C_{17}H_{12}N_2O_2$ ) C, H, N.

1-phénylindirubine

5 On procède comme décrit pour l'indirubine. En partant de 500 mg de 1-phénylisatine (2,24 mmole) et de 334 mg d'indoxylacétate (1,90 mmole), on obtient 597 mg (92,6 %) d'une poudre violette,  $R_f = 0,92$  (acétate d'éthyle/hexane 1/1 v/v) :  $^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6,83 (pt,  $J = 7,3$ , C7H), 7,05 (pt, C5'H), 7,16 (pt, C5H), 7,29 (pt, C6H), 7,42 (d,  $J = 8,0$ , C7'H), 7,53-7,48 (m) et 7,64-7,58 (m) (C6'h et 5 phényl-H, 7,69 (d,  $J = 7,3$ , C4'H), 8,92 (d,  $J = 7,6$ , C4H), 11,17 (s, N1'H) ;  $^{13}C$ -RMN (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  104,96 (s, C3), 108,71 (s, C7), 113,48 (s, C7'), 118,96 (s, C3a'), 15 120,80 (s, C3a), 121,50 (d,  $J = 159,1$ , Hz), et 122,34 (d,  $J_{C,H} = 160,8$ , Hz), (C5 et C5'), 124,44 (d) et 124,56 (d) (C6 et C4'), 126,75 (d,  $J = 161,5$ , C3"et C5"), 127,93 (d,  $J = 161,5$ , Hz) et 128,99 (d,  $J = 160,8$  Hz) (C4 et C4"), 129,46 (d,  $J = 161,5$ , C2"et C6"), 137,18 (d,  $J = 161,6$ , C6'), 139,11 (s) et 133,97 (s) (C7a' et C1"), 141,34 (s, C7a), 152,32 (s, C2'), 168,36 (s, C2), 188,44 (s, C3') ; MS  $m/e$  388 ( $M^+$ , 100), 311 (13), 310 (58), 309 (39) Anal. ( $C_{22}H_{14}N_2O_2$ ) C, H, N.

acide 3'-hydroxyiminoidirubine-5-sulfonique (sel de sodium)

25 On opère selon Lucius et al ci-dessus (méthode modifiée) avec 500 mg de sel de sodium de l'acide indirubine-5-sulfonique (0,644 mmole) et 400 mg de chlorhydrate d'hydroxylamine (5,76 mmole) dans 15 ml de pyridine. Le précipité produit en ajoutant 100 ml d'acide chlorhydrique et 20 ml d'une solution saturé de chlorure de sodium au 30 mélange réactionnel est combiné au précipité obtenu à partir du filtrat, qui a été produit en ajoutant 15 ml d'une solution saturé de chlorure de sodium. Ce produit brut est recristallisé à partir d'eau. On obtient 170 mg 35 (34,0 %) de plaquettes noires à écailles, à nuance rouge,

$R_f = 0,76$  (éthanol):  $^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6,82 (d,  $J = 8,1$ , C7H), 7,10-6,97 (m, C5'H), 7,41-7,39 (m, C6' et C7'), 7,48 (d,  $J = 7,9$ , C6H), 8,26 (d,  $J = 7,7$ , C4'H), 8,92 (s, C4H), 10,82 (s) et 11,80 (s) (N1H et N1'H), 13,79 (s, NOH) ;  $^{13}\text{C-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  98,64 (s, C3), 107,32 (d,  $J = 162,3$ , C7), 111,36 (d,  $J = 165,8$ , C7'), 116,59 (s, C3a'), 120,55 (d,  $J = 167,2$ , C5'), 121,42 (d,  $J = 159,5$ , C6), 121,65 (s, C3a), 123,74 (d,  $J = 163,0$ , C4), 128,02 (d,  $J = 167,8$ , C4'), 131,84 (d,  $J = 158,8$ , C6'), 138,21 (s, C5), 140,87 (s, C7a), 144,53 (s, C7a'), 145,52 (s, C2'), 151,32 (s, C3'), 171,17 (s, C2) Anal. ( $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{NaO}_2\text{S}$ ) C, H, N.

#### indirubine-5-sulfonamide

On opère comme décrit ci-dessus pour l'indirubine. En partant de 120 mg d'isatine-5-sulfonamide (0,530 mmole) et de 79 mg d'indoxylacétate (0,045 mmole), on obtient 79 mg (92,0 %) de 5- méthyl indirubine sous forme de poudre noire contenant 8% en masse d'indigo (l'indigo a été identifié par DC et  $^1\text{H-RMN}$ );  $R_f = 0,79$  (acétate d'éthyle):  $^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,04-7,08 (m, C7H et C5'H), 7,23 (s,  $\text{NH}_2$ ), 7,44 (d,  $J = 7,9$ , C7'H), 7,60 (pt, C6'H), 7,69 (d,  $J = 7,4$ , C6H), 7,74 (d,  $J = 8,1$ , C4'H), 9,31 (s, C4H), 11,15 (s) et 11,25 (s) (N1H et N1'H) ;  $^{13}\text{C-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  104,92 (s, C3), 113,56 (d,  $J = 159,9$ , C7'), 119,01 (s, C3a'), 121,13 (s, C3a), 121,72 (d,  $J = 165,2$ , C5'), 122,27 (d,  $J = 169,8$ , C6), 124,44 (d,  $J = 164,5$ , C4'), 126,98 (d,  $J = 159,2$ , C4), 109,22 (d,  $J = 165,2$ , C7), 137,24 (s, C5), 137,24 (d,  $J = 160,5$ , C6'), 139,32 (s, C7a'), 142,99 (s, C7a), 152,45 (s, C2'), 170,98 (s, C2), 188,52 (s, C3').

#### diméthylamide de l'acide indirubine-5-sulfonique

On opère comme décrit ci-dessus pour l'indirubine. En partant de 397 mg de diméthylamide de l'acide isatine 5-sulfonique (1,56 mmole) et de 246 mg d'indoxylacétate (1,40 mmole), on obtient 240 mg (46,5 %) de l'acide recherché sous forme de poudre violette,  $R_f = 0,39$  (acétate

d'éthyle/hexane 3/2 v/v):  $^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  2,65 (s, 2 CH<sub>3</sub>), 7,02-7,13 (m, C7H et C5'H), 7,44 (d,  $J = 8,1$ , C7'H), 7,57-7,72 (m, C6H, C4'H, et C6'H), 9,21 (s, C4H), 11,18 (s) et 11,33 (s) (N1H et N1'H);  $^{13}\text{C-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  37,20 (q,  $J = 139,4$ , CH<sub>3</sub>), 104,16 (s, C3), 109,11 (d,  $J = 165,8$ , C7), 113,22 (d,  $J = 167,2$ , C7'), 118,71 (s, C3 a'), 121,36 (d,  $J = 165,1$ , C5'), 121,48 (s, C3a), 123,18 (d,  $J = 172,0$ , C6), 124,22 (d,  $J = 163,7$ , C4'), 127,64 (s, C5), 128,06 (d,  $J = 166,5$ , C4), 136,93 (d,  $J = 164,4$ , C6'), 139,34 (s, C7a'), 143,53 (s, C7a), 152,10 (s, C2'), 170,51 (s, C2), 188,37 (s, C3'); MS  $m/e$  369 (M<sup>+</sup>, 83), 326 (6), 262 (84), 261 (100). Anal. (C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S) H, N; C: calc, 58.5 %; trouvé, 57.8 %.

(2-hydroxyéthyl)-amide de l'acide indirubine-5 sulfonique

On opère comme décrit pour l'indirubine. En partant de 150 mg du (2-hydroxyéthyl)-amide de l'acide isatine-5-sulfonique (0,630 mmole) et de 83 mg d'indoxylacétate (0,47 mmole), on obtient 143 mg (78,9 %) du composé recherché sous forme de poudre violette;  $R_f = 0,62$  (méthanol/ acétate d'éthyle 1/20 v/v):  $^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  2,84 (t,  $J(\text{CH}_2, \text{CH}_2) = 6,5$ , visible en ajoutant D<sub>2</sub>O, -N-CH<sub>2</sub>-), 3,40 (m, -CH<sub>2</sub>-O), 4,67 (t,  $J = 4,6$ , OH), 7,07 (m, C7H et C5'H), 7,43 -7,46 (m, C7'H et SO<sub>2</sub>-NH-; en ajoutant D<sub>2</sub>O: 7,44, d,  $J = 8,1$ , C7'H), 7,61 (pt, C6,H), 7,69-7,71 (m, C6H et C4'), 9,27 (s, C4H), 11,18 (s) et 11,29 (s) (N1H et N1'H);  $^{13}\text{C-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  45,00 (t,  $J = 138,0$ , -NH-CH<sub>2</sub>), 59,85 (t,  $J = 141,1$ , -CH<sub>2</sub>-OH), 104,52 (s, C3), 109,44 (d,  $J = 165,9$ , C7), 113,60 (d,  $J = 168,5$ , C7'), 118,92 (s, C3a'), 121,36 (s, C3a), 121,74 (d,  $J = 164,0$ , C5'), 122,95 (d,  $J = 162,4$ , C6), 124,52 (d,  $J = 159,6$ , C4'), 127,53 (d,  $^1J_{\text{C,H}} = 165,9$ , C4), 133,20 (s, C5), 137,29 (d,  $J = 163,4$ , C6'), 139,44 (s, C7a'), 143,32 (s, C7a), 152,46 (s, C2'), 170,87 (s, C2), 188,70 (s, C3'), MS  $m/e$  385 (M<sup>+</sup>, 40), 355 (48), 325 (29), 262 (35), 261 (100). Anal. (C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S) C, H, N.

bis-(2-hydroxyéthyl)-amide de l'acide indirubine-5-sulfonique

On opère comme décrit pour l'indirubine. En partant de 400 mg de bis-(2-hydroxyéthyl) amide de l'acide isatine-5-sulfonique bis-(2-hydroxyéthyl) amide (1,27 mmole) et 167 mg d'indoxyl acétate (0,953 mmole), on obtient 355 mg (86,7 %) de l'amide mentionné ci-dessus sous forme de poudre violette,  $R_f = 0,51$  (méthanol/ acétate d'éthyle 1/20 v/v):

$^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  3,20 (t,  $J = 6,5$ , 2 -N-CH $_2$ ), 3,56 (m, 2 -CH $_2$ O-), 4,84 (t,  $J = 5,5$ , 2 -OH), 7,09-7,05 (m, C7H et C5'H), 7,72-7,68 (m, C6H et C4'), 7,45 (d,  $J = 8,0$ , C7'H), 7,61 (m, C6'), 9,26 (s, C4H), 11,18 (s) et 11,32 (s) (N1H et N1'H);  $^{13}\text{C-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  51,32 (t,  $J = 135,0$ , 2 -NH-CH $_2$ ), 60,01 (t,  $J = 141,0$ , 2 -CH $_2$ -OH), 104,31 (s, C3), 109,48 (d,  $J = 165,3$ , C7), 113,62 (d,  $J = 168,5$ , C7'), 118,91 (s, C3a'), 121,69 (s, C3a), 121,79 (d,  $J = 164,0$ , C5'), 122,88 (d,  $J = 162,4$ , C6), 124,64 (d,  $J = 162,7$ , C4'), 127,98 (d,  $J = 165,2$ , C4), 131,51 (s, C5), 137,32 (d,  $J = 160,1$  Hz, C6'), 139,61 (s, C7a'), 143,59 (s, C7a), 152,48 (s, C2'), 170,81 (s, C2), 188,87 (s, C3'); MS  $m/e$  429 ( $M^+$ , 9), 369 (22), 365 (22), 355 (63), 261 (31), 43 (100). Anal. (C $_{20}$ H $_{19}$ N $_3$ O $_6$ S) C, H, N.

méthylamide de l'acide indirubine-5-sulfonique

On opère comme décrit ci-dessus pour l'indirubine. En partant de 380 mg du méthylamide de l'acide isatine-5-sulfonique (1,58 mmole) et de 227 mg d'indoxylacétate (1,30 mmole), on obtient 370 mg (80,1 %) de l'amide ci-dessus sous forme d'une poudre violette,  $R_f = 0,72$  (acétate d'éthyle):  $^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  2,46 (d,  $J = 5,0$ , CH $_3$ ), 7,05-7,09 (m, C7H et C5'H), 7,32 (q, NH-CH $_3$ ), 7,45 (d,  $J = 8,3$ , C7'H), 7,61 (m, C6'H), 7,67-7,71 (m, C6H et C4'), 9,27 (s, C4H), 11,18 (s) et 11,30 (s) (N1H et N1'H);  $^{13}\text{C-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  28,65 (q,  $J = 138,7$ , CH $_3$ ), 104,48 (s, C3), 109,41 (d,  $J = 165,7$ , C7), 113,58 (d,  $J = 165,7$ , C7'), 118,90

(s, C3a'), 121,42 (s, C3a), 121,73 (d,  $J = 171,0$ , C5'), 123,13 (d,  $J = 164,5$ , C6), 124,50 (d,  $J = 159,8$ , C4'), 127,61 (d,  $J = 165,7$ , C4), 131,93 (s, C5), 137,28 (d,  $J = 160,6$ , C6'), 139,43 (s, C7a'), 143,36 (s, C7a), 152,45 (s, C2'), 170,85 (s, C2), 188,68 (s, C3'); MS  $m/e$  255 ( $M^+$ , 15), 263 (18), 262 (100), 261 (7). Anal. ( $C_{17}H_{13}N_3O_4S$ ) C, H, N.

#### 5-iodoisatine

On opère comme décrit par Roedig, Mueller E. (Hrsg.), Methoden der organischen Chemie (Houbeyn-Weyl), Stuttgart, Georg Thieme Verlag 1960, 5/4, 586, et Borsche et al Chem.Ber.1924, 1770-1775,  $R_f = 0,60$  (acétone/éther de pétrole 40-70 1/1 v/v); PF 262 °C:  $^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6,75 (d,  $J = 8,3$ , C7H), 7,75 (s, C4H), 7,78 (d,  $J = 8,2$ , C6H), 11,09 (b, N1H);  $^{13}C$ -RMN (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  85,39 (s, C5), 114,59 (d,  $J = 167,1$ , C7), 119,89 (d,  $J = 7,2$ , C3a), 132,38 (d,  $J = 170,3$ , C4), 145,76 (d,  $J = 167,1$ , C6), 145,76 (d,  $J = 167,1$ , C6), 149,95 (b, C7a), 158,66 (s, C2), 183,06 (s, C3); MS  $m/e$  262 ( $M^+$ , 100), 234 (43).

#### 20 diméthylamide de l'acide isatine-5-sulfonique

On opère comme décrit par Haller, brevet DE 715760, 1938,  $R_f = 0,18$  (acétate d'éthyle /hexane 1 /1 v/v):  $^1H$ -RMN (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  2,62 (s, 2  $CH_3$ ), 7,12 (d,  $J = 8,2$ , C7H), 7,71 (s, C4H), 7,94 (d,  $J = 8,2$ , C6H), 11,47 (s, N1H);  $^{13}C$ -RMN (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  182,89 (s, C3), 159,37 (s, C2), 153,60 (s, C7a), 136,98 (d,  $J = 167,32$ , C6), 128,62 (s, C5), 123,27 (d,  $J = 169,2$ , C4), 118,05 (s, C3a), 112,68 (d,  $J = 169,2$ , C7), 37,48 (q,  $J = 140,1$ , 2  $CH_3$ ). Anal. ( $C_{10}H_{10}N_2O_4S$ ) C, H, N.

#### bis-(2-hydroxyéthyl)-amide de l'acide isatine-5-sulfonique

On opère comme décrit par Haller ci-dessus en partant de 526 mg de bis-(2-hydroxyéthyl)-amine (5,00 mmole) et de 1,00 g de 3,3-dichloro-2-oxo-2.3-dihydroindol-5-sulfonyle ( voir

Haller ci-dessus) (3,34 mmole). Le précipité qui se forme est huileux et boueux. On décante le surnageant, puis on mélange le précipité et le surnageant avec 5 ml d'eau. On porte à reflux 2 h. En refroidissant, on obtient un précipité de cristaux rouge. Rendement: 476 mg (45,3 %),  $R_f = 0,51$  (méthanol/acétate d'éthyle 1/20 v/v):  $^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  2,78 (t,  $J = 6,2$ , 2 -N-CH<sub>2</sub>-), 3,38 (t,  $J = 6,2$ , 2-CH<sub>2</sub>-O-), 7,08 (d,  $J = 8,2$ , C7), 7,78 (s, C4), 7,96 (d,  $J = 8,2$ , C6), 11,43 (s, N1H);  $^{13}\text{C-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  50,73 (t,  $J = 138,8,2$  -N-CH<sub>2</sub>-), 59,64 (t,  $J = 141,7$ , 2 -CH<sub>2</sub>OH-), 112,57 (d,  $J = 168,6$ , C7), 117,91 (s, C3a), 122,78 (d,  $J = 169,3$ , C4), 133,29 (s, C5), 136,44 (d,  $J = 166,4$ , C6), 153,28 (s, C7a), 159,37 (s, C2), 182,95 (s, C3). Anal. (C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S) C, H, N.

#### 15 6-iodoisatine

On opère comme décrit par Marvel et al, Organic Syntheses, Coll. Vol.1, 2<sup>nd</sup> ed.; Gilman, H Ed.; Wiley & Sons: New York, 1941, 327-330, en utilisant 1,50 g de 2-hydroxyimino-N-(3-iodophényl)-acétamide (5,17 mmole) et 3,9 ml d'acide sulfurique concentré. Après filtration, le produit brut, formé d'un mélange de 4-et 6-iodoisatine et de sous-produits, est purifié selon Sadler, J.Org.Chem. 1956, 21, 169-170 et Holt et al, Proc.R.Soc. London B 1958, 148, 481-494. On obtient 216 mg (15,0 %) de cristaux orange; PF 255-258 °C;  $R_f = 0,76$  (acétate d'éthyle/hexane 1/1 v/v):  $^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,25 (m, C4H et C7H), 7,45 (d,  $J = 7,6$ , C5H), 11,07 (s, N1H);  $^{13}\text{C-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  107,28 (d,  $J = 10,4$ , C6), 117,41 (s, C3a), 120,83 (d,  $J = 170,3$ , C7), 125,84 (d,  $J = 173,7$ , C4), 131,82 (d,  $J = 167,9$ , C5), 151,30 (s, C7a), 159,35 (s, C2), 183,79 (s, C3). Anal. (C<sub>8</sub>H<sub>4</sub>INO<sub>2</sub>) C, H, N.

#### 30 isoindigo

On opère comme décrit par Wahl et al, Compte rendus hebdomadaires des séances de l'académie des sciences, 1909, 716-19 et 4(5), 1039-43:  $R_f = 0,67$  (acétate d'éthyle/hexane

1/1 v/v):  $^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  6,85 (d,  $J=7,7$ , C7H et C7'H), 6,97 (pt, C5'H et C5'H), 7,34 (pt, C6H et C6'H), 9,07 (d,  $J=8,0$ , C4H et C4'H), 10,90 (s, N1H et N1'H);  $^{13}\text{C-RMN}$  (DMSO- $d_6$ ) 109,42 (d,  $J=162,5$ , C7 et C7'), 121,04 (d,  $J=161,2$ , C5 et C5'), 121,58 (s, C3a et C3a'), 129,21 (d,  $J=166,5$ , C6 et C6'), 132,52 (d,  $J=159,9$ , C4 et C4'), 133,24 (s, C3 et C3'), 143,98 (s, C7a et C7a'), 168,88 (s, C2 et C2'); MS  $m/e$  262 ( $M^+$ , 100), 234 (85), 205 (18). Anal. ( $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ ) C, H, N.

10 2,2'-bisindole

On opère comme décrit par Bergman et al, Tetrahedron 1995, 51 (19), 563-42,  $R_f = 0,82$  (UV, acétate d'éthyle /hexane 1/1): GC/MS  $R_t = 14,1$  min,  $m/e$  232 ( $M^+$ , 100);  $\lambda_{\text{max}}$ , (éthanol) 221 (4,78), 271 (4,00), 333 (4,80), 351 (4,79). Anal. ( $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2$ ) C, H, N.

15 3,3'-diphényl-2.2'-bisindole

On opère comme décrit par Fürstner et al, Angewandte Chemie, 1995, 107 (6), 725-8. La recristallisation à partir d'acétate d'éthyle / éther de pétrole (40-70) 115 v/v conduit à des cristaux incolores (55.8 %),  $R_f = 0,50$  (UV, acétate d'éthyle / éther de pétrole (40-70) 115 v/v): GC/MS  $R_t = 19,0$  min,  $m/e$  384 ( $M^+$ , 100).

isatin-5-sulfonamide

On refroidit au préalable une solution aqueuse à 25 % d'ammoniaque (5,0 ml) à 0-5°C avant d'ajouter un échantillon de 0,50 g de chlorure de 3,3-dichloro-2-oxo-2,3-dihydroindol-5-sulfonyle ( voir Haller ci-dessus), (1,7 mmole), par portions, en agitant et en refroidissant à nouveau. Après 2h, on ajoute une petite quantité de glace pilée et 20 % d'acide chlorhydrique jusqu'à réaction acide du mélange. Le solvant est éliminé sous vide et le résidu orange est séché sur KOH. La poudre jaune obtenue est extraite 3 fois avec 35 ml d'acétone. L'acétone est éliminée sous vide, ce qui conduit à 140 mg (36,4 %) de poudre orange,  $R_f = 0,73$  (acétate d'éthyle):  $^1\text{H-RMN}$  (DMSO-

d<sub>6</sub>)  $\delta$  7,05 (d,  $J = 8,2$ , C7), 7.41 (s, NH<sub>2</sub>), 7,85 (s, C4),  
 7,98 (d,  $J = 8,2$ , C6), 11,39 (s, NH); <sup>13</sup>C-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$   
 112,12 (d,  $J = 168,3$ , C7), 117,73 (s, C3a), 121,67 (d,  $J =$   
 166,8, C4), 134,97 (d,  $J = 165,4$ , C6), 138,36 (s, C5),  
 5 152,56 (s, C7a), 159,50 (s, C2), 184,22 (s, C3); MS m/e 226  
 (M<sup>+</sup>, 28), 198 (100).

(2-hydroxyéthyl)-amide de l'acide isatine-5-sulfonique

On opère selon Haller ci-dessus, en partant de 295 mg de 2-  
 aminoéthanol (4,83 mmole, 0,300 ml), 5,1 ml d'éthanol et  
 10 0,900 mg de chlorure 3.3-dichloro-2-oxo-2,3-dihydroindol-5-  
 sulfonyl (Haller) (3,01 mmole). Après 30 min d'agitation,  
 on ajoute à nouveau 0,100 ml de 2-aminoéthanol, et 15 min  
 plus tard 20 g de glace pilée et 0,900 ml d'acide  
 chlorhydrique à 20 %. En réchauffant à la température  
 15 ambiante, on obtient une masse huileuse qui se dépose au  
 fond du récipient. On laisse décanter le surnageant et le  
 solvant restant est éliminé sous vide. L'huile jaune  
 obtenue est portée à reflux dans l'eau pendant  
 2 h. En refroidissant, la solution orange obtenue précipite  
 20 374 mg (45,8 %) de cristaux jaune,  $R_f = 0,52$  (méthanol  
 /acétate d'éthyle 1/20 v/v): <sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  2,73- 2,82  
 (m, N-CH<sub>2</sub>-), 3,38 (t,  $J = 6.1$  Hz, -CH<sub>2</sub>-O-), 7,07 (d,  $J = 7,6$ ,  
 C7), 7,66 (t,  $J = 5,7$  Hz, -SO<sub>2</sub>-NH-), 7,81 (s, C4), 7,96 (d,  
 $J = 8,4$ , C6), 11,42 (s, N1 H).

25 méthylamide de l'acide isatine-5-sulfonique

On opère selon Haller ci-dessus, en partant de 0,572 ml  
 d'une solution aqueuse à 40 % de méthylamine (6,62 mmole),  
 5,6 ml d'éthanol et 1,00 g de chlorure de 3,3-dichloro-2-  
 oxo-2,3-dihydroindol-5-sulfonyl (Haller) (3,34 mmole). Le  
 30 précipité qui se forme est éliminé par filtration et on  
 porte à reflux dans l'eau pendant 2 h. Par refroidissement,  
 la solution précipite (cristaux jaune). Rendement: 420 mg  
 (52,3 %),  $R_f = 0,29$  (acétate d'éthyle /hexane 2/1 v/v): <sup>1</sup>H-  
 RMN (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  2,41 (d,  $J = 5,0$ , CH<sub>3</sub>), 7,08 (d,  $J = 8,3$ ,

C7), 7,48 (q,  $J=5,0$ ,  $\text{NH}_2$ ), 7,77 (s, C4), 7,95 (d,  $J=8,3$ , C6), 11,42 (s, NH);  $^{13}\text{C}$ -RMN (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  28,52 (q,  $J=139,2$ ,  $\text{CH}_3$ ), 112,40 (d,  $J=168,9$ , C7), 118,04 (s, C3a), 122,48 (d,  $J=169,2$ , C4), 133,13 (s, C5), 136,15 (d,  $J=166,0$ , C6),  
 5 153,44 (s, C7a), 159,44 (s, C2), 183,04 (s, C3).

2-hydroxyimino-N-(3-iodophényl)-acétamide

On opère comme décrit par Marvel et Hiers ci-dessus et on purifie le produit obtenu en procédant selon Holt and Sadler ci-dessus; PF 152-154 °C;  $R_f = 0,29$  (acétate  
 10 d'éthyle /hexane 1/1 v/v):  $^1\text{H}$ -RMN (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,12 (pt,  $J=8,1$ , C5'H), 7,44 (pt,  $J=7,9$ , C4'H ou C6'H), 7,63 (s, C2H), 7,65 (pt,  $J=8,2$ , C4'H ou C6'H), 8,16 (pt,  $J=1,7$ , C2'H), 10,27 (s, NH), 12,27 (s, C2NOH);  $^{13}\text{C}$ -RMN (DMSO- $d_6$ )  $\delta$   
 15 94,69 (d,  $J=11,7$ , C3'), 119,32 (d,  $J=165,7$ , C6'), 128,22 (d,  $J=168,0$ , C2'), 130,95 (d,  $J=162,8$ , C5), 132,57 (d,  $J=168,1$ , C4'), 140,06 (s, C1'), 144,05 (d,  $J=171,5$ , C2), 160,67 (s, C1).

. Tampons

Les tampons utilisés ont les compositions suivantes:

20 Tampon d'homogénéisation: - 60 mM de  $\beta$ -glycérophosphate, 15 mM de p-nitrophénylphosphate, 25 mM de Mops (pH 7,2), 15 mM d'EGTA, 15 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM de DTT, 1 mM vanadate de sodium, 1 mM de NaF, 1 mM de phénylphosphate, 10  $\mu\text{g}$  de leupeptine/ml, 10  $\mu\text{g}$  d'aprotinine/ml, 10  $\mu\text{g}$  d'inhibiteur de  
 25 trypsine de soja/ml et 100  $\mu\text{M}$  de benzamidine.

Tampon A : 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM de EGTA, 1 mM de DTT, 25 mM de Tris-HCl pH 7,5, 50  $\mu\text{g}$  d'héparine/ml.

Tampon C : tampon d'homogénéisation, mais renfermant 5 mM d'EGTA, et dépourvu de NaF et d'inhibiteurs de protéase.

30 Tris-tampon salin de Tween-20 (TBST) : 50 mM de Tris pH 7,4, 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween-20<sup>R</sup>.

Tampon de lyse hypotonique (HLB) : 50 mM de Tris-HCl pH 7,4, 120 mM de NaCl, 10% de glycérol, 1% de Nonidet-P40, 5 mM de DTT, 1 mM d'EGTA, 20 mM de NaF, 1 mM d'orthovanadate, 5  $\mu$ M de microcystine, 100  $\mu$ g/ml de chacun des produits suivants : leupeptine, aprotinine, pepstatine.

. Préparations de kinases et déterminations des activités

Les activités des kinases ont été déterminées dans le tampon A ou C (à moins d'indications contraires), à 30°C, à une concentration finale en ATP de 15  $\mu$ M. Les valeurs des essais à blanc ont été soustraites et les activités calculées en pmoles de phosphate incorporé pour une incubation de 10 min. Les valeurs des activités sont généralement exprimées en % de l'activité maximale, c'est-à-dire, en l'absence d'inhibiteurs.

Des essais témoins ont été réalisés à l'aide de dilutions appropriées de Me<sub>2</sub>SO. Dans quelques cas, comme indiqué ci-après, la phosphorylation des substrats est déterminée par autoradiographie après SDS-PAGE.

La GSK-3 $\beta$  utilisée est soit l'enzyme purifiée à partir du muscle de lapin ou exprimée et purifiée à partir de cellules d'insecte Sf9 (Hughes et al, 1992, Eur. J. Biochem., 203 : 305,311). Les déterminations ont été effectuées avec une dilution à 1/100 dans 1 mg de BSA/ml de DTT 10 mM, avec 5  $\mu$ l de GS-1 40  $\mu$ M comme substrat, dans le tampon A, en présence de 15  $\mu$ M [ $\gamma$ <sup>32</sup>P] ATP (3000 Ci/moles ; 1 mCi/ml) dans un volume final de 30  $\mu$ l. Après 30 minutes d'incubation à 30°C, des aliquotes de 25  $\mu$ l de surnageant ont été appliqués sur des bandes de papier de phosphocellulose Whatman P81, de 2,5 x 3 cm, et 20 secondes plus tard, les filtres ont été lavés 5 fois (pendant au moins 5 min. à chaque fois), dans une solution de 10 ml

d'acide phosphorique/l d'eau. Les filtres humides ont fait l'objet de comptage en présence de 1 ml de fluide de scintillation ACS (Amersham).

La CDK1/cycline B utilisée a été extraite à l'aide d'un tampon d'homogénéisation à partir d'ovocytes d'étoiles de mer (*Marthasterias glacialis*) et purifiée par chromatographie d'affinité sur des billes de p9<sup>CKShs1</sup>-Sépharose à partir desquelles le produit a été élué par du p9<sup>CKShs1</sup> libre, comme décrit par Meijer et al., 1997, (Methods in Enzymology, vol 283 : 113-128), et Borgne et al., 1999, J. Biol. Chem. 274 : 11977-11986.

L'activité kinase a été déterminée dans le tampon C, avec 1 mg d'histone H1/ml, en présence de 15 µM de [ $\gamma$ <sup>32</sup>P] ATP ((3000 Ci/mmol ; 1 mCi/ml) dans un volume final de 30 µl.

Après 10 minutes d'incubation à 30°C, des aliquotes de 25 µl de surnageant ont été déposés sur des papiers de phosphocellulose P81 et traités comme décrit ci-dessus.

La CDK5/p25 a été reconstituée en mélangeant des quantités égales de CDK5 et de p25 de mammifère recombinantes, exprimées dans *E.coli* sous forme de protéine de fusion GST (Glutathione-S-transférase) et purifiées par chromatographie d'affinité sur glutathione-agarose p25 est une version tronquée de p35, l'activateur de CDK5 de 35kDa. Son activité a été déterminée dans le tampon C comme décrit pour CDK1/cycline B.

. Phosphorylation *in vitro* et *in vivo* de tau :

Cellules et virus : on a cultivé les cellules Sf9 (Invitrogen, San Diego, CA) à 27°C dans un milieu de Grace de culture en monocouche (Gibco BRL, Gaithersburg, MD),

supplémenté avec 10% de sérum bovin foetal et 50 µg de gentamycine/ml et 2,5 µg d'amphotéricine/ml. BaculoGold a été obtenu auprès de PharMingen (San Diego, CA), et pVL1392 de InVitrogen.

5            La transfection de tau : on a excisé, à partir d'un vecteur d'expression bactérien pNG2 (Biernat et al., 1993, Neuron 11 : 153-163) et le gène codant pour htau23, l'isoforme tau humain le plus court, avec XbaI et BamHI. Le gène a été inséré dans le vecteur de transfert de  
10 baculovirus pVL1392 découpé avec les mêmes endonucléases. Le système BaculoGold a été utilisé pour la construction du vecteur contenant le baculovirus tau. L'ADN de BaculoGold est un type modifié de baculovirus contenant une délétion létale.

15            La co-transfection de l'ADN de BaculoGold avec un vecteur de transfert de baculovirus complément permet de récupérer la délétion létale de cet ADN viral et de reconstituer des particules de virus viables portant la séquence codant pour htau23.

20            L'ADN plasmidique utilisé pour les transfections a été purifié en utilisant des cartouches de QIAGEN (Hilden, Allemagne).

25            Les cellules Sf9 cultivées en monocouches ( $2 \times 10^6$  cellules dans un récipient de culture cellulaire de 60 mm) ont été co-transfectées avec de l'ADN de baculovirus (0,5 µg d'ADN de BaculoGold) et avec les dérivés de pVL1392 (2 µg) en utilisant la méthode de co-précipitation au phosphate de calcium. La présence de protéine recombinante a été examinée dans les cellules infectées 5 jours après  
30 l'infection par SDS-PAGE et Western blot.

Phosphorylation de tau dans les cellules Sf9.

Pour déterminer les effets des inhibiteurs de kinase sur la phosphorylation de tau, les cellules Sf9 infectées par le baculovirus exprimant htau23 ont été traitées 36 heures après l'infection, avec 50  $\mu\text{M}$  d'indirubine-3'-monoxime pendant 5 heures avant d'être recueillies. Pour obtenir des échantillons de tau témoins avec une phosphorylation plus élevée, les cellules Sf9 exprimant htau23 ont été traitées avec 0,2  $\mu\text{M}$  d'acide okadaïque pendant 5 heures avant récolte.

Western blot de tau :

Les cellules Sf9 ont été infectées avec un virus recombinant à une MOI de 1 à 5.

Les lysats cellulaires ont été préparés dans le tampon de lyse hypotonique (HLB).

Après 15 minutes de centrifugation à 16000 g, le surnageant a été récupéré et sa concentration en NaCl augmentée jusqu'à 500 mM. Le surnageant a été ensuite soumis à ébullition pendant 10 min. et recentrifugé à 16000 g pendant 15 min. Les protéines (3  $\mu\text{g}$ ) ont été résolues par SDS-PAGE, transférées sur une membrane de PVDF et étudiées avec un Western blot avec les anticorps suivants : AT-8 (1:2000), AT-180 (1:1000), AT-100 (1:500), PHF-1 (1:600) et l'anticorps polyclonal anti-tau K9JA.

La phosphorylation de tau in vitro a été effectuée en utilisant de la GSK-3 $\beta$  purifiée et la protéine tau-32 humaine recombinante en tant que substrat. Après 30 minutes d'incubation en présence de différentes concentrations d'indirubine-3'-monoxime, dans les conditions d'étude de la GSK-3 $\beta$  décrite ci-dessus, la réaction de la kinase a été arrêtée par addition de tampon

Laemmli. La protéine tau a été résolue en SDS-PAGE à 10% et son taux de phosphorylation visualisé par autoradiographie.

Exemple 1 : Etude de l'inhibition de GSK-3 $\beta$ , de CDK5/p25 et de CDK1/cycline B par les indirubines.

5 Les activités kinases ont été déterminées avec un substrat approprié (GSK-3 $\beta$ : GS1 peptide; CDKs: histone H1) en présence de 15  $\mu$ M d'ATP et à des concentrations croissantes en dérivés testés.

10 Les valeurs de IC<sub>50</sub> ont été calculées à partir des courbes dose/réponse et sont données dans le tableau 1.

Tableau 1

Composés	GSK3	CDK1	CDK5
5-iodo-indirubine-3'-monoxime	0,009	0,025	0,020
indirubine-3'-monoxime	0,022	0,180	0,100
5-SO <sub>2</sub> hydroxyéthylamide indirubine	0,033	0,065	0,050
5-SO <sub>3</sub> NH <sub>2</sub> -indirubine	0,040	0,110	0,075
5-nitro-indirubine	0,042	0,250	0,380
5-chloro-indirubine	0,050	0,280	0,230
5-bromo-indirubine	0,055	0,230	0,250
5-méthyl-indirubine	0,062	0,280	0,210
5-iodo-indirubine	0,068	0,220	0,200
5-fluoro-indirubine	0,078	0,350	0,750
5-SO <sub>3</sub> Na-indirubine 3'-monoxime	0,080	0,005	0,007
5-SO <sub>2</sub> -méthylamide-indirubine	0,110	0,080	0,020
6-iodo-indirubine	0,130	0,800	1,500
5-SO <sub>2</sub> diméthylamide-indirubine	0,180	0,100	0,060
5-5'-dibromo-indirubine	0,250	600	200
5-SO <sub>3</sub> H-indirubine	0,280	0,051	0,065
5'-bromo-indirubine	0,350	0,510	4
5-SO <sub>2</sub> dihydroxyéthylamide-indirubine	0,400	0,150	0,150
Indirubine	0,600	10,000	5,500
acide 5'-bromo-indirubine-sulfonique	4,000	0,080	0,075

Les déterminations effectuées à titre comparatif avec d'autres indigoïdes, comme les dérivés d'isatine ou d'indigo, donnent les résultats rapportés dans le tableau 2.

Tableau 2

Composés	GSK3	CDK1	CDK5
isatine-5-sulfonique acide-dihydroxyéthylamide	29	600	800
3-indoxylacétate	70	>1000	>1000
6-iodo-isatine	75	600	800
acide isatine-5-sulfonique-diméthylamide	85	>1000	>1000
3,3'-diphényl-2,2'-bisindol	180	500	500
1-phényl-indirubine	200	500	800
acide indigo-5,5',7,-trisulfonique (sel K3)	280	>1000	>1000
5-nitro-isatine	310	>1000	>1000
iso-indigo	320	40	130
acide indigo-5,5',7,7'-tétrasulfonique (sel K4)	350	>1000	>1000
indigo carmine	360	400	>1000
2-(2indolyl)indole	380	700	300
5-bromo-3-indoxylacétate	400	>1000	>1000
Indigo	550	>1000	>1000
5-iodo-isatine	>1000	300	800
5-bromo-isatine	>1000	600	>1000
1-méthyl-indirubine	>1000	>1000	>1000
Isatine	>1000	>1000	>1000
5-fluoro-isatine	>1000	>1000	>1000
5-chloro-isatine	>1000	>1000	>1000
5-méthyl-isatine	>1000	>1000	>1000
acide 5-sulfonique isatine, sel de sodium	>1000	>1000	>1000
1-méthyl-isatine	>1000	>1000	>1000
1-phényl-isatine	>1000	>1000	>1000

L'examen de ces 2 tableaux montre que, parmi les indigoïdes, seuls les dérivés d'indirubine exercent à la fois un effet inhibiteur vis-à-vis de GSK-3 $\beta$  et de CDKs. Il ressort en effet clairement de ces résultats que ni l'isatine, ni l'indigo ou leurs dérivés, n'exercent d'effet significatif sur l'une de ces 3 kinases.

Les figures 1A à 1D donnent les courbes dose-réponse pour la 5-iodo-indirubine-3'-monoxime (A), la 5,5'-dibromoindirubine (B), l'acide 5-sulfonique indirubine-3'-monoxime (C) et l'indirubine-3'-monoxime (D). L'inhibition de GSK-3 $\beta$  et des CDKs est déterminée comme indiqué plus haut.

L'activité est exprimée en % de l'activité maximale (sans inhibiteurs).

### 15 Exemple 2 : Etude du mécanisme d'action des indirubines

On procède à cet effet à des expériences de cinétique en faisant varier à la fois les niveaux d'ATP et les concentrations en indirubine-3' -monoxime.

Les résultats obtenus sont donnés sur la figure 2 (1/V en fonction de 1/ATP).

Les concentrations en ATP dans le mélange réactionnel varient de 0,05 à 0,25 mM, la concentration de GS-1 étant maintenue constante à 6,7  $\mu$ M. Dans l'encadré, on a reporté les pentes en fonction des concentrations à partir du premier tracé. La constante d'inhibition apparente ( $K_i$ ) est indiquée par une flèche.

On constate que l'indirubine-3' -monoxime agit en compétition avec l'ATP pour se fixer.

La linéarité de la pente dans l'encadré de la figure montre qu'il s'agit d'un inhibiteur linéaire.

La constante apparente d'inhibition  $K_i$  est de 50 nM.

Exemple 3 : Etude de l'inhibition par les indirubines, *in vitro* et *in vivo*, de la phosphorylation de tau par GSK-3 $\beta$

5 On rapporte les résultats obtenus avec l'indirubine-3' -monoxime sur la phosphorylation d'un substrat physiologique, constitué par la protéine tau liant des microtubules.

10 On utilise une protéine tau humaine recombinante exprimée dans une bactérie. La protéine est phosphorylée *in vitro* par GSK-3 $\beta$  en présence des concentrations croissantes en indirubine-3' -monoxime. On procède ensuite à une résolution par SDS-PAGE, suivie d'une autoradiographie.

15 La figure 3 donne les résultats obtenus et montre que la phosphorylation est inhibée de manière dose-dépendante par l'indirubine-3' -monoxime, avec une IC<sub>50</sub> autour de 100 nM.

Des études *in vivo* ont été également effectuées.

20 Les cellules Sf9 exprimant htau23 ou bien n'ont pas subi de traitement (-) ou ont été exposées à 0,2  $\mu$ M d'acide okadaïque (OA), ou à 50  $\mu$ M d'indirubine-3' -monoxime ou à NG-97 pendant 5h.

25 Les lysats cellulaires (3  $\mu$ g de htau23) ont été résolus par SDS-PAGE, colorés au bleu de Coomassie ou mis à réagir avec divers anticorps. K9JA (anticorps pan-tau) reconnaît toutes les préparations renfermant tau. AT8, AT 180 et PHF1 sont spécifiques pour différents motifs phosphorylés SP ou TP à savoir, respectivement, Ser 202 ; Thr 205, Thr 231; Ser 235 et Ser 396 ; Ser 404  
30 (numérotation dans htau 40, qui correspond à l'isoforme le plus long de la protéine tau humaine). AT 100 reconnaît la

protéine tau phosphorylée à T 212 et S214 (réaction très spécifique de la protéine tau chez la maladie d'Alzheimer, mais qui se produit également dans les cellules Sf9, si les 2 sites sont phosphorylés).

5            La disparition du signal AT100 après traitement avec l'indirubine-3'-monoxime montre que ce dérivé est bien capable d'inhiber une activité de type GSK-3 $\beta$  dans les cellules Sf9.

Exemple 4 : Etude de l'inhibition par les indirubines, *in vitro* et *in vivo*, de la phosphorylation de DARPP-32 par CDK5/p25

15            La protéine neuronale DARPP-32 a été identifiée comme substrat physiologique de CDK5/p25. DARPP-32 devient un inhibiteur de kinase cAMP-dépendante (PKA) lorsqu'il est phosphorylé par CDK5/p25 sur Thr 75.

            Cette protéine a été utilisée comme substrat pour la phosphorylation *in vitro* par CDK5/p25.

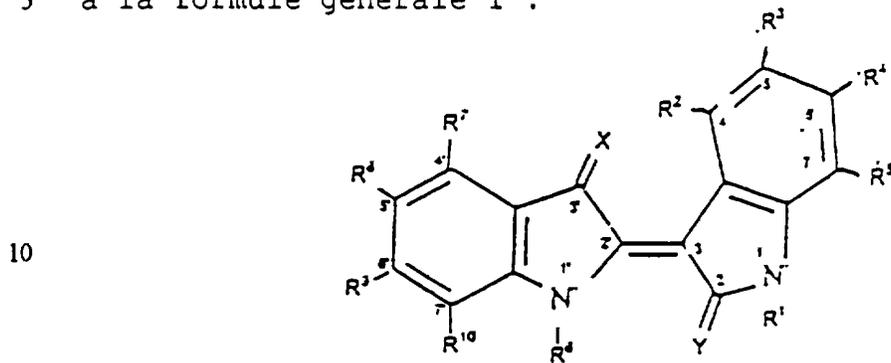
20            On constate que l'indirubine-3'-monoxime inhibe cette phosphorylation de manière concentration-dépendante, avec une IC<sub>50</sub> autour de 100 nM.

            La phosphorylation de DARPP-32 par CDK5/p25 peut être contrôlée avec un anticorps phosphospécifique dirigé contre DARPP-32 phospho-Thr 75.

25            On n'observe pas de phosphorylation *in vivo* sur ce site dans le tissu p35/. On constate une inhibition par l'indirubine-3' -monoxime, ce qui montre que les indirubines sont capables d'inhiber CDK5 *in vivo*.

## REVENDEICATIONS

1. Utilisation pour la fabrication de médicaments  
inhibiteurs de la GSK-3 $\beta$  de dérivés d'indirubine répondant  
5 à la formule générale I :



dans laquelle R<sup>1</sup> et R<sup>6</sup>, identiques ou différents,  
représentent un atome d'hydrogène, un atome d'halogène; un  
15 groupe hydroxy; un groupe méthylènehydroxy; un radical  
alcoyle ou alkyloxy ou méthylènealkoxy, à chaîne droite ou  
ramifiée, en C1 à C18; un radical cycloalkyle ayant 3 à 7  
atomes de carbone, comprenant le cas échéant un ou  
plusieurs hétéroatomes; un radical aryle, aralkyle ou  
20 aryloxy, substitué ou non substitué, comprenant le cas  
échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe mono-, di-  
ou trialkylsilyle ayant 1 à 6 de carbone, indépendamment  
l'un de l'autre, dans chaque cas, dans le groupe alkyle à  
chaîne droite ou ramifiée; un groupe mono-, di- ou  
25 triarylsilyle, avec des groupes aryle substitués ou non,  
indépendamment l'un de l'autre, dans chaque cas; un groupe  
trifluorométhyle; un groupe -COM; -COOM; ou -CH<sub>2</sub>COOM, avec  
M représentant un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en C1  
à C18, à chaîne droite ou ramifiée, substituée le cas  
30 échéant par un ou plusieurs groupes hydroxy et/ou amino, ou  
un groupe aryle comprenant le cas échéant un ou plusieurs  
hétéroatomes, pouvant être substitué par un ou plusieurs  
atomes d'halogène, radicaux alkyle ou groupe alcoxy; un  
groupe -NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, dans lequel R<sup>11</sup> et R<sup>12</sup>, identiques ou  
35 différents, représentent un atome d'hydrogène, un radical

alkyle à chaîne droite ou ramifiée, en C1 à C18, le cas échéant substitué en outre par un ou plusieurs groupes hydroxy et/ou amino, un groupe aryle, substitué ou non, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un  
5 groupe acyle; un groupe méthylèneamino  $-CH_2-NR^{11}R^{12}$ , dans lequel  $R^{11}$  et  $R^{12}$  présentent les significations ci-dessus; un groupe benzyle, dans lequel le noyau benzène comprend, le cas échéant, un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe méthylèncycloalkyle avec 3 à 7 atomes de carbone,  
10 comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un résidu d'acide aminé physiologique lié à l'azote, comme un amide; un O-glycoside ou un N-glycoside, dans lequel le glycoside est choisi parmi les monosaccharides ou les disaccharides; ou un groupe méthylènesulfonate;  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  
15  $R^5$ ,  $R^7$ ,  $R^8$ ,  $R^9$  et  $R^{10}$ , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène; d'halogène; un groupe hydroxy; un groupe nitroso; un groupe nitro; un groupe alkoxy; un groupe alkyle à chaîne droite ou ramifiée, en C1 à C18, le cas échéant substitué par un ou plusieurs groupes hydroxy et/ou amino; un groupe aryle, substitué ou non, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes ; un groupe aralkyle, substitué ou non, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe aryloxy, substitué ou non comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un  
20 groupe méthylènearyloxy, substitué ou non, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe cycloalkyle, avec 3 à 7 atomes de carbone, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe méthylèncycloalkyle, avec 3 à 7 atomes de carbone,  
25 comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe trifluorométhyle; un groupe  $-COM$ ;  $-COOM$ ; ou  $CH_2COOM$ , avec M représentant un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en C1 à C18, à chaîne droite ou ramifiée, substituée le cas échéant en outre par un ou plusieurs groupes hydroxy et/ou  
30 amino, ou un groupe aryle comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes, pouvant être substitué par un ou

plusieurs atomes d'halogène, groupes alkyle ou groupes alcoxy ; un groupe  $-NR^{11}R^{12}$ , dans lequel  $R^{11}$  et  $R^{12}$ , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène, un radical alkyle à chaîne droite ou ramifiée, en C1 à C18, le cas échéant substitué en outre par un ou plusieurs groupes hydroxy et/ou amino, un groupe aryle substitué ou non, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes, un groupe acyle, ou dans lequel l'atome d'azote fait partie d'un groupe cycloalkyle ayant 3 à 7 atomes de carbone, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes; un groupe  $-CONR^{11}R^{12}$ , dans lequel  $R^{11}$  et  $R^{12}$  présentent les significations ci-dessus; un groupe hydroxylamino; un groupe phosphate; un groupe phosphonate; un groupe sulfate; un groupe sulfonate; un groupe sulfonamide; un groupe  $-SO_2NR^{11}R^{12}$ , dans lequel  $R^{11}$  et  $R^{12}$  présentent les significations données ci-dessus; un groupe azo  $-N=N-R^{13}$ , dans lequel  $R^{13}$  représente un groupe aromatique, le cas échéant substitué par un ou plusieurs groupes carboxyle, phosphoryle ou sulfonate, ou un groupe O-glycoside ou N-glycoside, dans lequel le glycoside est choisi parmi les monosaccharides ou les dissaccharides; ou  $R^1$  et  $R^5$ , et  $R^6$  et  $R^{10}$ , respectivement, forment ensemble, indépendamment l'un de l'autre, un cycle ayant 1 à 4 groupes  $CH_2$ , le cas échéant substitué; et X et Y, identiques ou différents, représentent un atome d'oxygène; de soufre; de sélénium; de tellurium; un groupe  $-NR^{14}$ , dans lequel  $R^{14}$  représente un atome d'hydrogène, un groupe alkyle, à chaîne droite ou ramifiée, en C1 à C18, le cas échéant substitué par un ou plusieurs groupes carboxyle, phosphoryle ou sulfonate, un groupe aryle substitué ou non, comprenant le cas échéant un ou plusieurs hétéroatomes, un groupe aralkyle, ou un groupe sulfonate; ou  $-NOR^{14}$ , dans lequel le groupe  $R^{14}$  présente les significations données ci-dessus, et les sels de ces dérivés physiologiquement acceptables.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que, dans lesdits dérivés d'indirubine, un ou plusieurs atomes d'un ou plusieurs cycles benzéniques sont remplacés par des atomes d'azote.

5

3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que dans lesdits dérivés d'indirubine, un ou plusieurs systèmes cycliques aromatiques ou non aromatiques, qui comprennent, le cas échéant, un ou plusieurs hétéroatomes indépendamment l'un de l'autre, sont condensés au système indirubine.

4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que les dérivés d'indirubine sont liés à un ester de polyéthylèneglycol ou à un éther de polyéthylèneglycol par des liaisons, respectivement, ester ou éther.

5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que, dans lesdits dérivés d'indirubine, X et Y, identiques ou différents, représentent un groupe = O ou = NOH.

6. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que les substituants  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  et  $R^8$  desdits dérivés d'indirubine présentent les significations suivantes :

-  $R^3$ : un atome d'hydrogène, d'halogène, un radical alkyle, un groupe  $-SO_3H$ ,  $-SO_2NH_2$ ,  $-SO_2-N-(CH_3)_2$ ,  $-SO_2-N-C_2H_5-OH$ ,  $-SO_2-N-(C_2H_5-OH)_2$ ,  $-SO_2-NH-CH_3$ ,

-  $R^4$  et  $R^8$ , indépendamment l'un de l'autre: un atome d'hydrogène ou d'halogène,

-  $R^1$ : un radical alkyle ou aryle, les autres substituants donnés sur la formule (I) représentant un atome d'hydrogène.

35

7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que dans lesdits dérivés d'indirubine,  $X = Y$ , ces deux substituants représentant un groupe = O.

5

8. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que les substituants  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  et  $R^8$ , dans lesdits dérivés d'indirubine, répondent aux significations suivantes :

10

-  $R^1$ : alkyle, notamment méthyle, et phényle

-  $R^3$ : hydrogène, halogène (F, Cl, Br, I),  $NO_2$ ,

-  $SO_3H$ ,  $-SO_2NH_2$ ,  $-SO_2-N(CH_3)_2$ ,  $-SO_2-N-C_2H_5-OH$ ,  $-SO_2-N-(C_2H_5-OH)_2$ ,  $-SO_2-NHCH_3$ ,

-  $R^4$  et  $R^8$  : halogène, en particulier I ou Br,

15 les autres substituants donnés dans la formule (I) représentant un atome d'hydrogène.

9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que lesdits dérivés sont choisis parmi  
20 l'indirubine, la 5-iodo-indirubine, la 5-bromo-indirubine, la 5-chloro-indirubine, la 5-fluoro-indirubine, la 5-méthyl-indirubine, la 5-nitro-indirubine, la 5- $SO_3H$ -indirubine, la 5'-bromo-indirubine, la 5-5'-dibromo-indirubine ou l'acide 5'-bromo-indirubine 5-sulfonique.

25

10. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que, dans lesdits dérivés d'indirubine, X représente un groupe = NOH et Y un groupe = O.

30

11. Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que  $R^3$  représente un atome d'halogène, notamment I, ou un groupe  $-SO_3Na$ .

35

12. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que lesdits dérivés sont choisis parmi

l'indirubine-3'-monoxime, la 5-iodo-indirubine-3'-monoxime et la 5-SO<sub>3</sub>Na-indirubine-3'-monoxime.

5 13. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que les médicaments sont préparés pour une administration par voie orale, sous forme de gélules, comprimés, dragées ou capsules.

10 14. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que les médicaments sont préparés pour une administration par voie injectable, sous forme de solution.

15 15. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, pour le traitement de pathologies impliquant GSK-3 $\beta$  et CDK5.

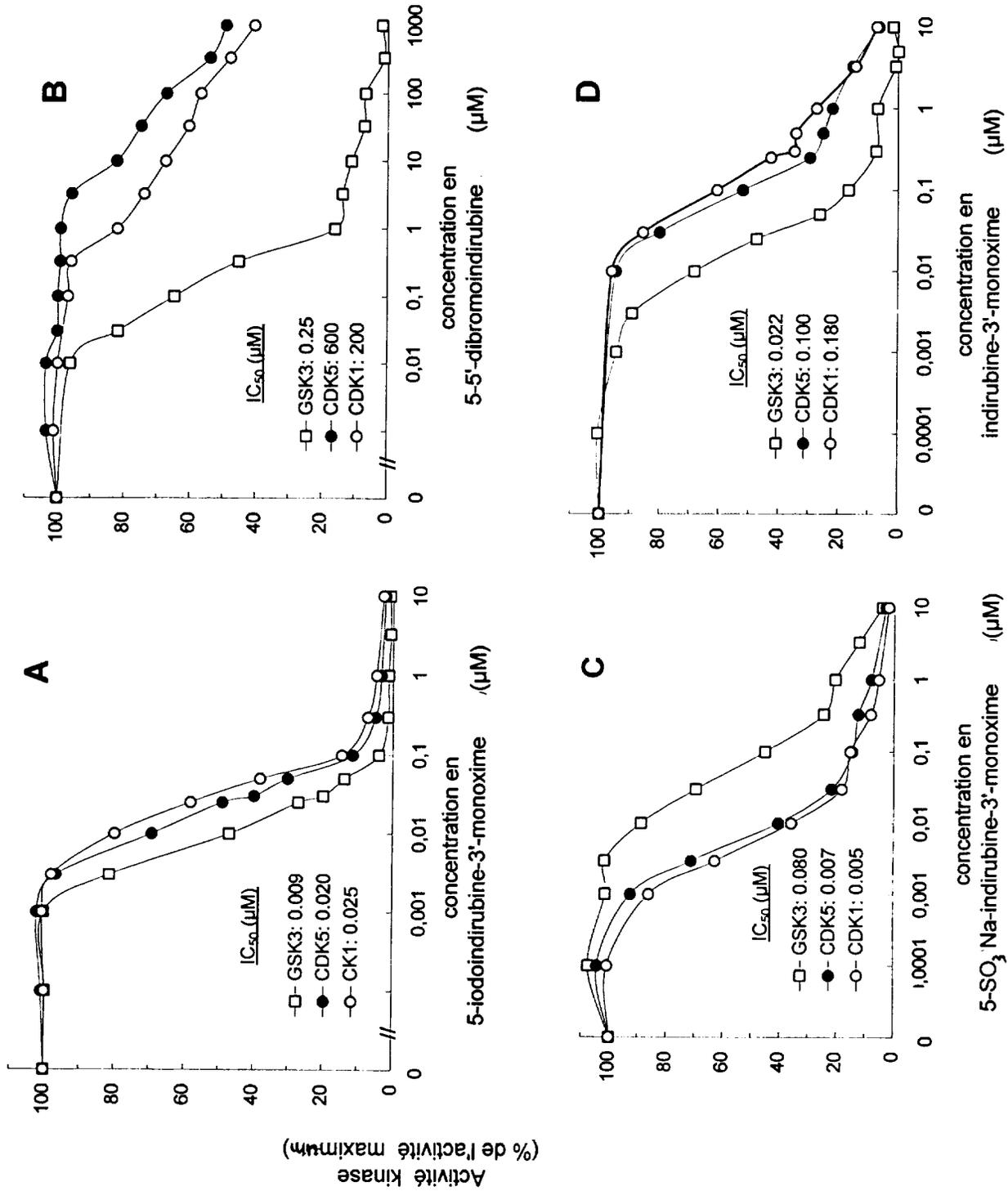


FIGURE 1

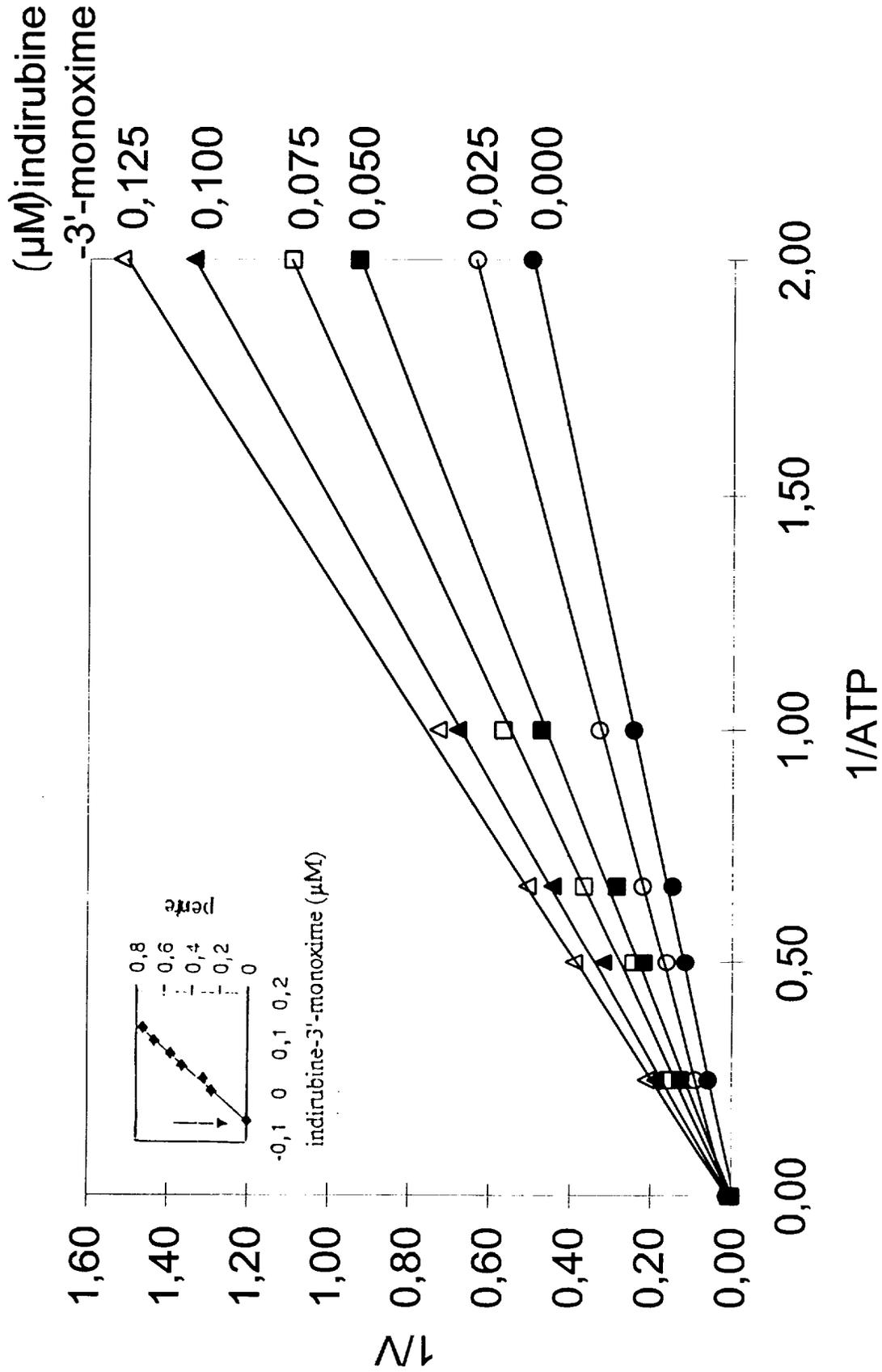


FIGURE 2

In vitro - GSK3

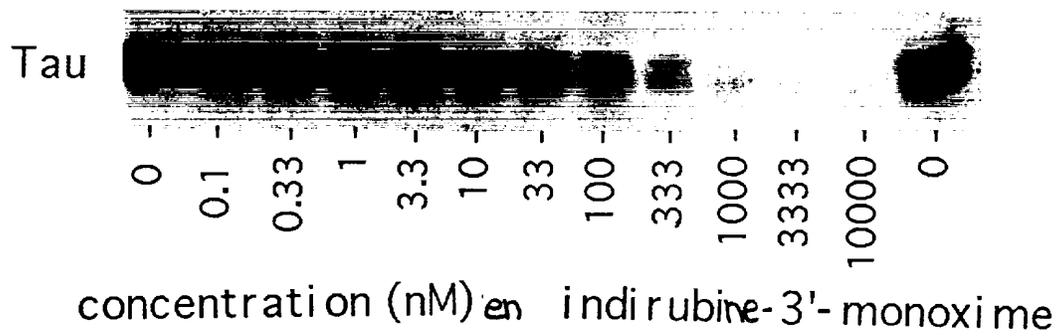


FIGURE 3

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
E,D	EP 0 966 963 A (EISENBRAND G. , CNRS) 29 décembre 1999 (1999-12-29) * le document en entier * ---	1,4-15	A61K31/404 A61P9/00 A61P13/12 A61P17/06 A61P25/28 A61P25/18 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 131, no. 17, 25 octobre 1999 (1999-10-25) Columbus, Ohio, US; abstract no. 223114, HOESSEL, RALPH ET AL: "Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases" XP000856197 & NAT. CELL BIOL. (1999), 1(1), 60-67 ,  * le document en entier * ---	1,4-12, 15	
A	MEIJER L. ET AL: "Properties and potential applications of chemical inhibitors of cyclin-dependent Kinases." PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, (1999) 82/2 (279-284). XP000938154 * le document en entier * ---	1,5,6, 10,12,15	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			A61K C07D
			-/--
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
27 septembre 2000		Gac, G	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P/4C35)

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
T	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 131, no. 23, 6 décembre 1999 (1999-12-06) Columbus, Ohio, US; abstract no. 306604, GRAY, NATHANAEL ET AL: "ATP-site directed inhibitors of cyclin-dependent kinases" XP000856195 & CURR. MED. CHEM. (1999), 6(9), 859-875 ,  * page 861, colonne de droite, alinéas 2,3 * * page 865, colonne de droite * * page 871, colonne de droite, alinéas 2-5 *	1,5,6, 10,12,15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
A	WO 97 41854 A (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 13 novembre 1997 (1997-11-13) * le document en entier *	1,13-15	
T	MEIJER L.: "Cyclin-dependent kinases inhibitors as potential anticancer, antineurodegenerative, antiviral and antiparasitic agents." DRUG RESISTANCE UPDATES, (2000) 3/2 (83-88). XP000931278 * le document en entier *	1,5,6, 10,12,15	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
27 septembre 2000		Gac, G	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant	

1

EPO FORM 1503 12.98 (P04C35)

**RECHERCHE INCOMPLÈTE  
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE C**

Numéro de la demande

FA 581929  
FR 9914749

Certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche ou ont fait l'objet d'une recherche incomplète, à savoir:

Revendications ayant fait  
l'objet de recherches complètes:  
9,12

Revendications ayant fait  
l'objet de recherches incomplètes:  
1,4-8,10,11,13-15

Revendications n'ayant pas fait  
l'objet de recherches:  
2,3

Raison:

La formule I de la revendication 1 contient un très grand nombre possible d'alternatives pour des composés différents, alors que seuls certains sont spécifiquement décrits (voir les exemples pages 10-25 et 32) et/ou revendiqués (revendications 9,12). Par conséquent, les revendications contenant cette formule I manquent de concision et de support/fondement comme il est requis dans la CBE Article 84.

De plus, les revendications 2 et 3 décrivent des composés dont les formules chimiques ne sont ni incluses dans la formule I telle que décrite dans la revendication I (outrepassent la définition de la formule I), ni ne sont supportées par des exemples ou des revendications de produits spécifiques.

La revendication 4 et ses revendications dépendantes peuvent être considérées comme dépendantes de la formule I (n'attendent pas à la structure générale des composés et donc au concept inventif commun de la demande).

Par ailleurs, la revendication 15 a été cherchée en relation avec le concept de la revendication 1 (inhibiteurs de la GSK-3 $\beta$ ) et non sous ses multiples aspects spécifiques (diverses maladies/pathologies) indépendants.

Par conséquent, la recherche a été effectuée :

- \* entièrement sur les revendications 9-12
- \* partiellement sur les revendications 1,4-8,10,11,13-15
- \* pas du tout sur les revendications 2 et 3.