

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **231213**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **424865**

(22) Data zgłoszenia: **13.03.2018**

(51) Int.Cl.

C07C 235/54 (2006.01)

C07C 271/24 (2006.01)

C07C 323/22 (2006.01)

A61K 31/165 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(54)

Pochodne kolchicyny, sposób ich wytwarzania i zastosowanie

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

13.08.2018 BUP 17/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

28.02.2019 WUP 02/19

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA
W POZNANIU, Poznań, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ADAM HUCZYŃSKI, Poznań, PL
GRETA KLEJBOROWSKA, Gniezno, PL
URSZULA MAJCHER, Stalowa Wola, PL
JOANNA WIETRZYK, Wrocław, PL
EWA MAJ, Baranów Sandomierski, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Wojciech Lisiecki

PL 231213 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są potrójnie modyfikowane w pozycji C-4, C-7 i C-10 pochodne kolchicyny oraz sposób ich wytwarzania.

Chemiczna modyfikacja związków pochodzenia naturalnego, wykazujących aktywność biologiczną, jest obecnie jedną z najbardziej efektywnych metod poszukiwania nowych leków. Kolchicina – pseudoalkaloid izolowany głównie z *Colchicum autumnale* i *Gloriosa superba* jest dobrze znanym czynnikiem antymitotycznym oraz przeciwzapalnym. W testach *in vivo* wykazuje dobre właściwości cytostaticzne. Mechanizm działania cytostaticznego kolchicyny polega na wiązaniu się jej z tubuliną w kolchicynowym miejscu wiążącym tubuliny, czego skutkiem jest zablokowanie mitozy (podziału komórki). Powstawanie trwałego kompleksu kolchicina – tubulina hamuje polimeryzację mikrotubul, co prowadzi do zablokowania tworzenia wrzeciona kariokinetycznego i zahamowania mitozy. Zastosowanie kliniczne kolchicyny w leczeniu nowotworów jest obecnie ograniczone ze względu na jej stosunkowo wysoką toksyczność i niską biodostępność.

W zgłoszeniu patentowym WO2011021397 ujawniono podwójnie modyfikowane pochodne kolchicyny podstawione atomami halogenu w pozycji C-4 oraz posiadające zmodyfikowaną grupę w pozycji C-7. Aktywność przeciwnowotworowa niektórych ujawnionych związków została sprawdzona wobec ludzkich nowotworowych linii komórkowych A549 (ludzki gruczolak płuca) oraz HT-29 (ludzki nowotwór jelita grubego). Związki modyfikowane w pozycji C-4 i C-7 ogólnie charakteryzowały się dobrą cytotoksycznością. W publikacji nie podano żadnych danych o działaniu badanych substancji na komórki zdrowe, zatem nie można określić współczynników selektywności badanych związków, które pozwalają przewidzieć czy dana substancja będzie w pierwszej kolejności działała na komórki nowotworowe czy na zdrowe komórki organizmu. Badania dotyczące pochodnych podstawionych atomem halogenu w pozycji C-4 prowadził również Yasobu i współpracownicy [Yasobu *et al.*, *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2(5), 2011, 348–352]. Z danych ujawnionych w publikacji wynika, że związki podstawione atomem halogenu w pozycji C-4 charakteryzowały się wyższą cytotoksycznością od niemodyfikowanej kolchicyny w stosunku do linii komórkowej A549 (ludzki gruczolak płuca) oraz porównywalną cytotoksycznością jak niemodyfikowana kolchicina w stosunku do linii komórkowych HT-29 (ludzki nowotwór jelita grubego) oraz HCT116 (ludzki rak okrężnicy). Informacje zawarte w tej publikacji ograniczają się do testów *in vitro* w stosunku do komórek nowotworowych, zatem nieznane jest działanie tych związków na zdrowe komórki ludzkie, czyli nieznane są współczynniki selektywności tych związków.

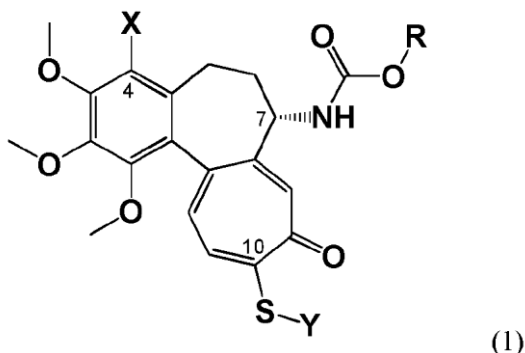
W zgłoszeniu patentowym CA2808277, co prawda ujawniono m.in. podwójnie modyfikowane pochodne kolchicyny podstawione grupą metylosulfidową w pozycji C-10 oraz różnorodnymi podstawnikami w pozycji C-7, jednak nie ma tam żadnych doniesień (w przeciwieństwie do innych związków ujawnionych w tym zgłoszeniu) dotyczących badań cytotoksyczności dlatego typu pochodnych.

Kerekes i współpracownicy opisali badania nad pochodnymi kolchicyny modyfikowanymi w pozycji C-7 i C-10 [P. Kerekes *et al.*, *J Med Chem*, 1985, 28, 1204–1208]. Badania cytotoksyczności otrzymanych związków prowadzono *in vivo* na myszach z myszą nowotworową linią komórkową P388 (mysia białaczka). Dla przebadanych pochodnych określono toksyczność na poziomie związku wyjściowego. Pochodne z grupą karbaminianową w pozycji C-7 oraz grupą metylosulfidową w pozycji C-10 charakteryzowały się dobrym oddziaływaniem z tubuliną, ale słabą aktywnością w stosunku do linii komórkowej P388. Informacje zawarte w tej publikacji dotyczą wyłącznie badań *in vivo* wobec myszy z wszczepionymi mysimi komórkami nowotworowymi. Organizm myszy istotnie różni się od organizmu człowieka zatem nie można wyników uzyskanych dla komórek mysich bezpośrednio odnosić do komórek ludzkich, zatem nie można wnioskować o cytotoksyczności badanych pochodnych w stosunku do ludzkich nowotworowych linii komórkowych oraz zdrowych komórek organizmu.

Powszechnie wiadomo, że aktywność przeciwnowotworowa określonych farmakoforów jest specyficzna w stosunku do danej linii komórkowej. Dodatkowo żadna z otrzymanych do tej pory pochodnych kolchicyny nie znalazła zastosowania farmaceutycznego, a poszukiwania związku, który będzie charakteryzował się wysoką aktywnością przeciwnowotworową oraz dobrą selektywnością w stosunku do komórek nowotworowych wciąż trwają.

Celem wynalazku było wytworzenie nowych pochodnych kolchicyny modyfikowanych w pozycji C-4, C-7 i C-10 mogących znaleźć zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej w szczególności wobec nowotworów podobnych do ludzkich nowotworowych linii komórkowych A549, MCF-7, LoVo, LoVo/DX.

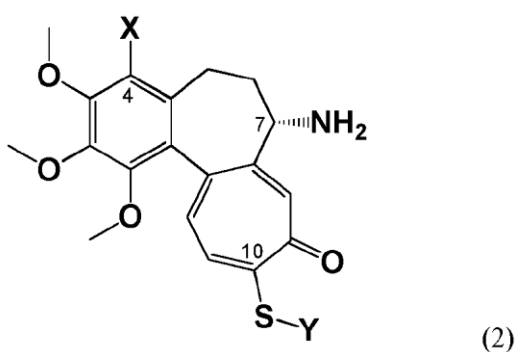
Przedmiotem wynalazku są *N*-karbaminianowe pochodne *N*-deacetylo-4-(bromo/chloro/jodo)-10-demetylo-10-alkilotiokolchicyny o wzorze ogólnym 1



gdzie:

- X oznacza Cl, Br lub I;
- Y oznacza grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 4 atomów węgla;
- R oznacza:
 - grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 10 atomów węgla,
 - grupę alkilową prostą zawierającą od 1 do 5 atomów węgla podstawioną w dowolnej pozycji łańcucha od 1 do 3 atomami halogenu, które mogą znajdować się zarówno przy tym samym jak i przy różnych atomach węgla,
 - grupę alkilową prostą zawierającą od 1 do 5 atomów węgla podstawioną w pozycji terminalnej grupą hydroksylową,
 - grupę alkilową prostą zawierającą od 2 do 10 atomów węgla zawierającą w dowolnej pozycji łańcucha wiązania eterowe,
 - grupę alkilową prostą zawierającą od 2 do 10 atomów węgla zawierającą grupę hydroksylową przy terminalnym atomie węgla oraz w dowolnej pozycji łańcucha wiązania eterowe.

W drugim aspekcie przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania nowych *N*-karbaminianów *N*-deacetylo-4-(bromo/chloro/jodo)-10-demetylo-10-alkilotiokolchicyny o wzorze ogólnym 1, w którym X, R i Y mają wyżej podane znaczenie w reakcji pomiędzy związkiem o wzorze ogólnym 2,



w którym X i Y mają wyżej podane znaczenie w reakcji z alkoholem o wzorze ogólnym 3,



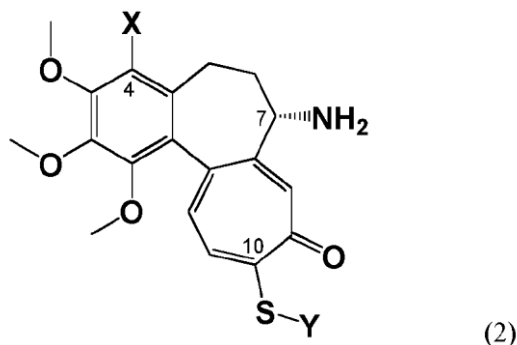
w którym R ma wyżej podane znaczenie w obecności trifosgeny, jako aktywatora oraz aminy alifatycznej.

Reakcję prowadzi się w rozpuszczalniku apolarnym chloroalifatycznym, aromatycznym lub w tetrahydrofuranie, korzystnie w chloroformie, chlorku metylenu, toluenie, benzenie, tetrahydrofuranie. Korzystne jest prowadzenie reakcji w warunkach bezwodnych. Jako aminę alifatyczną stosuje się korzystnie tributyloaminę, tripropyloaminę, triizobutyloaminę, triizopropyloaminę, diizopropyloaminę, *N,N*-diizopropyletyloaminę, trietyloaminę, najkorzystniej trietyloaminę. Aminy kompleksują powstający w wyniku rozpadu trifosgeny produkt uboczny – chlorowódor. Wiązanie chlorowodoru przez aminę zapobiega

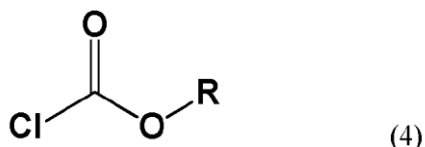
zachodzeniu niepożądanych reakcji i zapobiega rozpadowi związku o wzorze 2. Z uwagi na właściwości trifosgeny i możliwość zachodzenia reakcji ubocznych, etap aktywacji polegający na dodaniu trifosgeny do mieszaniny związku o wzorze 2 i aminy alifatycznej rozpuszczonych w rozpuszczalniku apolarnym powinien być prowadzony w obniżonej temperaturze $<5^{\circ}\text{C}$. Aktywacja związku o wzorze 2 w obniżonej temperaturze trwa na ogół od 10 do 30 minut. Po tym czasie zaprzestaje się chłodzenia, mieszaninę reakcyjną doprowadza się do temperatury pokojowej i dodaje się do niej odpowiedni alkohol o wzorze ogólnym 3, a następnie miesza w temperaturze pokojowej do czasu zakończenia reakcji, korzystnie stopień przereagowania kontroluje się za pomocą chromatografii TLC. Następnie w przypadkach, gdy wytrącił się osad chlorowodoru aminy alifatycznej oddziela się go od roztworu.

Jeżeli reakcja była prowadzona w innym rozpuszczalniku niż rozpuszczalnik chloroalifatyczny, rozpuszczalnik odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszcza w rozpuszczalniku chloroalifatycznym, korzystnie w chlorku metylenu lub chloroformie po czym produkt ekstrahuje roztworem $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ (0,5 M), a następnie wodą. Warstwę organiczną odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszcza się przy użyciu chromatografii kolumnowej, korzystnie przy użyciu chromatografu CombiFlash® stosując kolumnę wypełnioną SiO_2 oraz mieszaninę rozpuszczalników organicznych, korzystnie heksan:octan etylu przy wzrastającym gradiencie stężeń octanu etylu od 0 do 100%.

W trzecim aspekcie przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania nowych *N*-karbaminianów *N*-deacetylo-4-(bromo/chloro/jodo)-10-demetoksy-10-alkiltio-kolchicyny o wzorze ogólnym 1, w którym X, R i Y mają wyżej podane znaczenie w reakcji pomiędzy związkiem o wzorze ogólnym 2.



w którym X i Y mają wyżej podane znaczenia a odpowiednim chloromrówczanem o wzorze ogólnym 4,



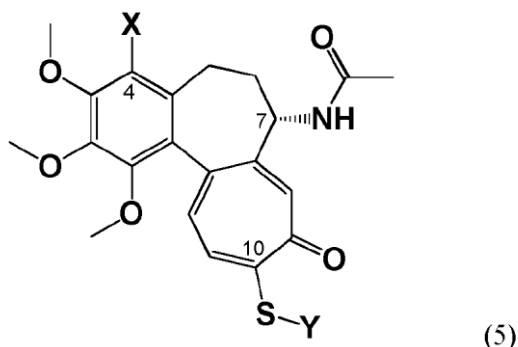
gdzie R oznacza:

- grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 10 atomów węgla,
- grupę alkilową prostą zawierającą od 1 do 5 atomów węgla podstawioną w dowolnej pozycji łańcucha od 1 do 3 atomami halogenu, które mogą znajdować się zarówno przy tym samym jak i przy różnych atomach węgla,
- grupę alkilową prostą zawierającą od 2 do 10 atomów węgla zawierającą w dowolnej pozycji łańcucha wiązania eterowe,

w obecności aminy alifatycznej.

Reakcję prowadzi się w rozpuszczalniku aprotycznym chloroalifatycznym, acetonitrylu lub tetrahydrofuranie, korzystnie chloroformie, chlorku metylenu, acetonitrylu lub tetrahydrofuranie. Korzystne jest prowadzenie reakcji w warunkach bezwodnych. Jako aminy stosuje się aminy alifatyczne, korzystnie tributylaminę, tripropylaminę, triizobutylaminę, triizopropylaminę, diizopropylaminę, *N,N*-diizopropyletyloaminę, trietyloaminę, najkorzystniej trietyloaminę.

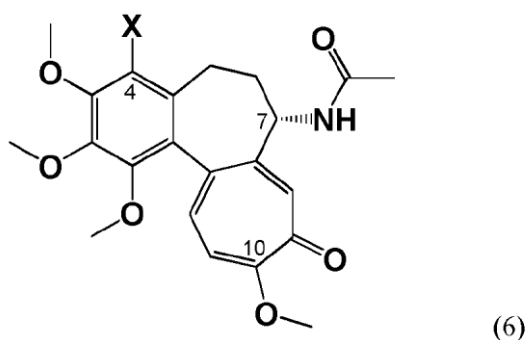
Związek pośredni o wzorze ogólnym 2 można otrzymać ze związku o wzorze ogólnym 5



w którym X i Y mają wyżej podane znaczenie, w wyniku jego deacetylacji pod wpływem roztworu kwasu nieorganicznego.

Reakcję deacetylacji związku o wzorze 5 prowadzi się w roztworze kwasu nieorganicznego korzystnie roztworze kwasu siarkowego (VI) o stężeniu 2 M – 5 M, kwasu solnego o stężeniu 2 M – 5 M, najkorzystniej kwasu solnego o stężeniu 2 M – 3 M. Reakcję można prowadzić w temperaturze pokojowej lub w podwyższonej temperaturze <100°C. Z uwagi na skrócenie czasu reakcji korzystne jest prowadzenie jej w podwyższonej temperaturze 70–90°C. Stopień przereagowania substratu kontroluje się za pomocą chromatografii TLC.

Związek pośredni o wzorze ogólnym 5 można otrzymać w reakcji pomiędzy związkiem o wzorze ogólnym 6



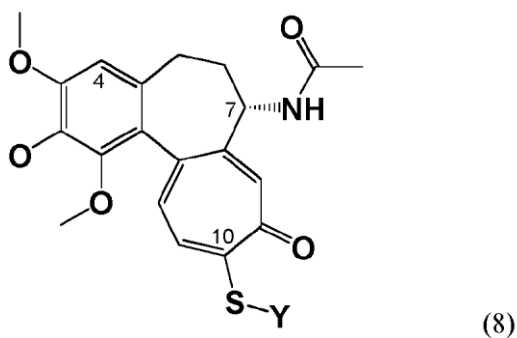
w reakcji z alkilotioianem o wzorze ogólnym 7



w którym Y ma wyżej podane znaczenie.

Reakcję prowadzi się w mieszaninie wody i alkoholu (1/1, v/v), korzystnie metanolu, etanolu. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej.

Związek pośredni o wzorze ogólnym 5 można również otrzymać w reakcji pomiędzy związkiem o wzorze ogólnym 8



a:

– *N*-chlorosukcynoimidem (NCS) w celu podstawienia atomu chloru,

lub

– *N*-bromosukcynoimidem (NBS) w celu podstawienia atomu bromu,

lub

– *N*-jodosukcynoimidem (NIS) w celu podstawienia atomu jodu.

Reakcję prowadzi się w rozpuszczalniku protycznym tj. prostym kwasie karboksylowym, korzystnie kwasie mrówkowym lub kwasie octowym lub w rozpuszczalniku polarnym aprotycznym tj. prostym nitylu, korzystnie acetonitrylu. Reakcję można prowadzić zarówno w temperaturze pokojowej, jak i w podwyższonej temperaturze (<100°C).

W czwartym aspekcie przedmiotem wynalazku jest zastosowanie pochodnych kolchicyny według wynalazku do wytwarzania środków stosowanych w terapii przeciwnowotworowej.

Badania przeprowadzone *in vitro* wobec ludzkich linii komórek nowotworowych potwierdziły działanie cytotoksyczne, przewyższające aktywność związku wyjściowego – kolchicyny. W badaniach wykorzystano następujące linie komórkowe:

– A549 – ludzki gruczolak płuc,

– MCF-7 – ludzki gruczolak piersi,

– LoVo – ludzki gruczolak jelita grubego wrażliwy na doksorubicynę,

– LoVo/DX – ludzki gruczolak jelita grubego oporny na doksorubicynę.

W badaniach wykorzystano również normalne mysie fibroblasty BALB/3T3, w celu określenia współczynnika selektywności badanych związków, który pozwala przewidzieć czy dana substancja będzie w pierwszej kolejności działała na komórki nowotworowe czy na zdrowe komórki organizmu.

W tabeli 1 podano dane dotyczące stosowanych w badaniach linii komórkowych.

T a b e l a 1

Symbol linii komórkowej	Nazwa linii komórkowej	Źródło pochodzenia linii komórkowej
A549	ludzki gruczolak płuc	ECACC 86012804
MCF-7	ludzki gruczolak piersi	ECACC 86012803
LoVo	ludzki gruczolak jelita grubego wrażliwy na doksorubicynę	ATCC CCL-229
LoVo/DX	ludzki gruczolak jelita grubego oporny na doksorubicynę	Prof. E. Borowski, Politechnika Gdańska
BALB/3T3 clone A31	normalne mysie fibroblasty	ATCC CCL-163

W trakcie badań cytotoksyczności stosowano media hodowlane i odczynniki podane w tabeli 2.

Tabela 2

Nazwa	Producent
Medium hodowlane dla linii A-549	• OptiMEM+RPMI1640 (1:1) (PChO, IITD PAN, Wrocław) • 5% FBS HyClone (GE Healthcare, USA), • 2 mM L-Glutamina (Sigma Aldrich, Niemcy) • 0,1 mg/ml streptomycyna, 100 U/ml penicylina (odpowiednio: Sigma Aldrich, Niemcy i Polfa Tarchomin, Polska)
Medium hodowlane dla linii MCF-7	• Eagle medium (PChO, IITD PAN, Wrocław) • 10% FBS (Sigma-Aldrich, Niemcy) • 2 mM L-Glutamina (Sigma-Aldrich, Niemcy) • 8 µg/mL insulina (Sigma-Aldrich, Niemcy) • 1 % aminokwasy (Sigma-Aldrich, Niemcy) • 0,1 mg/ml streptomycyna, 100 U/ml penicylina (odpowiednio: Sigma Aldrich, Niemcy i Polfa Tarchomin, Polska)
Medium hodowlane dla linii LoVo	• OptiMEM+RPMI1640 (1:1) (PChO, IITD) • 5% FBS HyClone (GE Healthcare, USA), • 2 mM L-Glutamina (Sigma Aldrich, Niemcy) • 1 mM pirogronian sodu (Sigma Aldrich, Niemcy) • 0,1 mg/ml streptomycyna, 100 U/ml penicylina (odpowiednio: Sigma Aldrich, Niemcy i Polfa Tarchomin, Polska)
Medium hodowlane dla linii LoVoDX	Medium dla linii LoVo/DX jak dla LoVo oraz doksorubicyna (Accord Healthcare Ltd, UK) o stężeniu 10 µg/100 ml medium.
Medium hodowlane dla linii BALB3T3	• Dulbecco medium (Gibco, UK) • 10 % FBS HyClone (GE Healthcare, USA) • 2 mM L-Glutamina (Sigma Aldrich, Niemcy) • 0,1 mg/ml streptomycyna, 100 U/ml penicylina (odpowiednio: Sigma Aldrich, Niemcy i Polfa Tarchomin, Polska)
Medium hodowlane do rozcieńczeń związków	• OptiMEM+RPMI1640 (1:1) (PChO, IITD PAN, Wrocław) • 5% FBS HyClone (GE Healthcare, USA), • 2mM L-Glutamina (Sigma Aldrich, Niemcy) • 0,1 mg/ml streptomycyna, 100 U/ml penicylina (odpowiednio: Sigma Aldrich, Niemcy i Polfa Tarchomin, Polska)
10mM TRIS	1. Woda dejonizowana ogólnolaboratoryjna niejałowa 2. TRIZMA BASE (Sigma-Aldrich, Niemcy)
1% kwas octowy	1. Woda dejonizowana ogólnolaboratoryjna niejałowa 2. Kwas octowy 80% CZDA (POCH SA, Gliwice)
0,1 % roztwór sulforodaminy B (SRB)	1. Sulforhodamine B sodium salt (Sigma-Aldrich, Niemcy) 2. 1% kwas octowy
50% kwas tróchlorooctowy (TCA)	1. Woda dejonizowana ogólnolaboratoryjna niejałowa 2. Kwas trichlorooctowy CZDA (POCH SA, Gliwice)
Cisplatyna	Koncentrat do sporządzania roztworu do infuzji; 1 mg/ml (10 mg/10 ml); 1 fiol. 10 ml (Teva Pharmaceuticals Sp. z o.o., Warszawa, Polska)
Doksorubicyna	Koncentrat do sporządzania roztworu do infuzji; 2 mg/ml; 1 fiol. 10 ml (Accord Healthcare Ltd, UK)

Badania cytotoksyczności zostały przeprowadzone zgodnie z poniżej opisaną procedurą.

Roztwory wyjściowe (stock solutions) testowanych związków o stężeniu 10 mg/ml przygotowywano do każdego eksperymentu *ex tempore*, rozpuszczając 1 mg preparatu w 100 µl DMSO. Rozpuszczalnikiem dla dalszych rozcieńczeń było medium hodowlane. Związki przetestowano w przedziałach stężeń od 100 do 0,001 µg/ml.

Oznaczenie działania cytotoksycznego badanych związków oraz związków referencyjnych – powszechnie stosowanych chemioterapeutyków tj. doksorubicyny i cisplatyny wykonywano w 96-godzinnych hodowlach *in vitro*. Dla oznaczenia aktywności antyproliferacyjnej związków wobec wybranych linii komórkowych zastosowano test kolorymetryczny SRB wg P. Skehan *et al.*, *Journal of the National Cancer Institute*, 1990, 82:1107–1112, mierzący zahamowanie proliferacji docelowych komórek na podstawie pomiaru ilości białka komórkowego. W każdym doświadczeniu próbki zawierające określone stężenia preparatu nanoszono na płytki 96-dołkowe w trzech powtórzeniach. Doświadczenia powtarzano minimum trzy razy.

- Komórki (pochodzące z hodowli *in vitro*) nanoszono do dołków płytki w liczbie 1×10^4 w przypadku linii LoVo, LoVo/DX, MCF-7 oraz BALB3T3 lub $0,5 \times 10^4$ dla linii A549 komórek w 100 µl medium hodowlanego danej linii komórkowej, a następnie inkubowano w 37°C, w wilgotnej atmosferze (60–90%) nasyconej 5% CO₂.
- Po 24 godzinach do dołków dodawano rozcieńczenia badanych związków w badanych stężeniach w objętości 100 µl medium hodowlanego do rozcieńczeń, a do dołków przeznaczonych na kontrolę wzrostu komórek nietraktowanych oraz dołków przeznaczonych na kontrolę medium bez komórek dodano 100 µl samego medium hodowlanego, stosowanego w przypadku związków do ich rozcieńczeń.
- Płytki inkubowano przez kolejne 72 godziny w inkubatorze (37°C, w wilgotnej atmosferze (60–90%) nasyconej 5% CO₂).
- Po zakończeniu inkubacji komórek ze związkami wykonywano test SRB.
- W każdym doświadczeniu próbki zawierające określone stężenia preparatu nanoszono w trzech powtórzeniach, po 4 stężenia dla danego związku. Kontrolę wzrostu komórek nietraktowanych prowadzono w 9 dołkach, a w kolejnych 3 dołkach stosowano tylko medium hodowlane bez komórek (kontrola tła). Doświadczenia powtarzano 3–5 razy.

Odczyt SRB:

Po upływie czasu inkubacji testu do każdego dołka dodano po 50 µl zimnego 50% kwasu trójchlorooctowego (TCA) i inkubowano przez 60 minut w temperaturze pokojowej, po czym płytki 4-krotnie przepłukano wodą, a następnie osuszono na ręcznikach papierowych. Następnie do każdego dołka dodano po 50 µl 0,1% roztworu sulforodaminy B (SRB) w 1% kwasie octowym w celu wybarwienia strąconego w dołku białka komórkowego. Po 30-minutowej inkubacji z SRB w temperaturze pokojowej płytki 4-krotnie płukano 1% kwasem octowym i ponownie osuszano na ręcznikach papierowych. W kolejnym etapie do każdego dołka dodano po 150 µl 10 mM buforu TRIS powodującego rozpuszczenie związanego z białkiem komórek barwnika. Gęstość optyczną poszczególnych próbek odczytywano przy długości fali 540 nm przy użyciu uniwersalnego czytnika płytkowego Synergy H4 firmy BioTek Instruments USA, Winooski VT, USA.

Na podstawie pomiaru absorbancji poszczególnych dołków wyliczano % zahamowania proliferacji dla każdego ze związków w danym stężeniu według wzoru:

$$\% \text{ zahamowania proliferacji} = \left(\left(\frac{A_t - A_m}{A_k - A_m} \right) \times 100 \right) - 100$$

gdzie,

A_m – średnia wartość absorbancji medium kontrolnego

A_k – średnia wartość absorbancji kontroli komórek, tj. komórek nietraktowanych

A_t – średnia wartość absorbancji komórek potraktowanych badanymi związkami w danym stężeniu.

Przy obliczaniu średniej wartości absorbancji dla danego zestawu dołków, tzn. komórki nietraktowane, komórki traktowane danym związkiem o danym stężeniu, kontrola samego medium, odrzucano wartości odstające na podstawie współczynnika zmienności CV 10%. Z danych % zahamowania proliferacji wyznaczano parametr IC₅₀ według metody opisanej w D. Nevozhay *et al.*, *Plos One* 2014, 9:10. Następnie, z kolejnych 3–5 powtórzeń testu, wyliczano średnią wartość IC₅₀ i odchylenie standardowe.

Dla wszystkich badanych pochodnych wyznaczono wskaźnik IC₅₀, który oznacza stężenie związku potrzebne do zahamowania wzrostu komórek o 50%. Dla porównania analogiczne badania

przeprowadzono z użyciem znanych środków cytotoksycznych a mianowicie cisplatyny i doksorubicyny. Wyniki badań aktywności cytotoksycznej przedstawione w formie stężenia wyrażonego w μM dla wybranych związków przedstawione są w tabeli 3. Wszystkie otrzymane pochodne wykazują bardzo wysoką aktywnością cytotoksyczną, wyższą lub porównywalną do powszechnie stosowanych leków przeciwnowotworowych tj. doksorubicyny i cisplatyny. Dodatkowo większość otrzymanych pochodnych charakteryzuje się korzystnymi współczynnikami selektywności (SI). $SI > 1,0$ wskazuje, że związek wykazuje wyższą skuteczność oddziaływania na komórki nowotworowe niż toksyczność w stosunku do komórek zdrowych.

T a b e l a 3

Związek	A549		MCF-7		LoVo		LoVo/DX			BALB/3T3
	IC ₅₀ [μM]	SI	IC ₅₀ [μM]	SI	IC ₅₀ [μM]	SI	IC ₅₀ [μM]	SI	RI	IC ₅₀ [μM]
Kolchicina	0,125	1,1	0,054	2,6	0,108	1,3	1,69	0,1	15,7	0,139
11	0,081	1,7	0,040	3,5	0,081	1,7	0,847	0,2	10,5	0,141
12	0,009	10,4	0,019	5,0	0,007	13,4	0,056	1,7	8,0	0,094
13	0,020	6,1	0,040	3,0	0,020	6,1	0,081	1,5	4,1	0,121
14	0,059	2,0	0,098	1,2	0,020	5,9	0,079	1,5	4,0	0,118
15	0,074	1,4	0,057	1,8	0,074	1,4	1,010	0,1	13,7	0,104
16	0,030	4,6	0,055	2,5	0,018	7,7	0,074	1,9	4,1	0,138
17	0,089	1,9	0,132	1,3	0,054	3,2	0,089	1,9	1,7	0,173
18	0,093	2,1	0,125	1,1	0,281	0,5	4,240	< 0,1	15,1	0,135
19	0,099	1,1	0,136	0,8	0,048	2,2	4,510	< 0,1	94,0	0,106
20	0,089	1,4	0,114	1,1	0,051	2,4	0,239	0,5	4,7	0,122
21	0,109	1,1	0,125	1,0	0,064	1,9	0,413	0,3	6,5	0,124
22	0,101	1,1	0,108	1,1	0,065	1,7	0,680	0,2	10,5	0,113
Dokso- rubicyna	0,258	0,6	0,386	0,4	0,092	1,8	4,75	<0,1	51,6	0,166
Cisplatyna	6,367	0,6	10,70	0,4	4,37	0,9	5,70	0,7	1,3	3,90

Wartość IC₅₀ – stężenie związku, które odpowiada 50% hamowaniu wzrostu komórek nowotworowych;

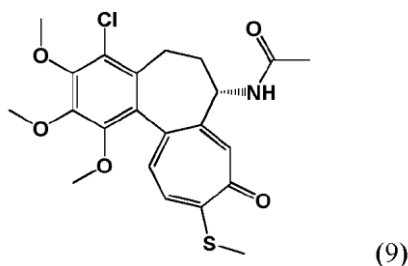
Indeks RI (*Resistance Index*): $RI = IC_{50} \text{ LoVo/DX} / IC_{50} \text{ LoVo}$;

Indeks SI (*Selectivity Index*) = $IC_{50} \text{ dla normalnej linii komórkowej (BALB/3T3)} / IC_{50} \text{ dla poszczególnych linii komórek nowotworowych}$.

Wynalazek ilustrują przykłady

Przykład 1

Otrzymywanie 4-chloro-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny o wzorze 9



Metoda 1

Do roztworu 4-chlorokolchicyny (500 mg, 1,15 mmol) w mieszaninie metanol / woda (1/1, v/v, 5 ml) dodano metanotiolan sodu (roztwór wodny 21%, 0,77 ml, 2,30 mmol) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 72 h. Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej dodano wodę destylowaną (150 ml). Całość ekstrahowano czterokrotnie CH_2Cl_2 . Połączone warstwy organiczne wysuszono nad MgSO_4 , przesączono i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono przy użyciu chromatografu CombiFlash® stosując kolumnę wypełnioną SiO_2 oraz mieszaninę octan etylu:metanol przy wzrastającym gradiencie stężeń metanolu od 0 do 50%.

Otrzymano 4-chloro-10-demetoksy-10-metylotiokolchicynę z wydajnością 73%.

Metoda 2

Do roztworu 10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny (500 mg, 1,20 mmol) w acetonitrylu dodano NCS (169 mg, 1,27 mmol) i mieszano w temperaturze pokojowej w atmosferze azotu przez 72 h. Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej dodano wodny nasycony roztwór $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (100 ml). Całość ekstrahowano czterokrotnie CH_2Cl_2 . Połączone warstwy organiczne wysuszono nad MgSO_4 , przesączono i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono przy użyciu chromatografu CombiFlash® stosując kolumnę wypełnioną SiO_2 oraz mieszaninę octan etylu:metanol przy wzrastającym gradiencie stężeń metanolu od 0 do 50%.

Otrzymano 4-chloro-10-demetoksy-10-metylotiokolchicynę z wydajnością 70%.

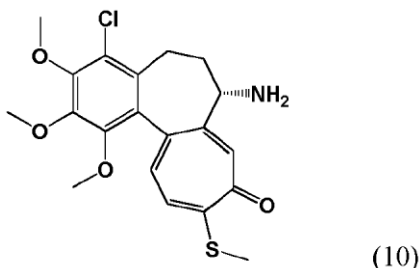
ESI-MS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 450, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 472, $[2\text{M}+\text{H}]^+$ 889, $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ 921.

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 182,4, 170,1, 159,1, 151,3, 150,2, 149,7, 146,6, 137,3, 134,81, 131,7, 129,9, 128,1, 126,4, 122,1, 61,6, 61,5, 61,1, 52,2, 34,5, 25,9, 22,8, 15,1.

^1H NMR (403 MHz, CDCl_3) δ 7,98 (d, $J = 6,7$ Hz, 1H), 7,44 (s, 1H), 7,29-7,24 (m, 1H), 7,08 (d, $J = 10,8$ Hz, 1H), 4,58 (dt, $J = 13,1, 6,7$ Hz, 1H), 3,98 (s, 3H), 3,96 (s, 3H), 3,61 (d, $J = 6,1$ Hz, 3H), 3,24 (dd, $J = 13,5, 4,8$ Hz, 1H), 2,44 (s, 3H), 2,27 (ddd, $J = 18,0, 12,1, 6,0$ Hz, 1H), 2,20-2,09 (m, 1H), 2,00 (d, $J = 1,2$ Hz, 3H), 1,92-1,80 (m, 1H).

Przykład 2

Otrzymywanie *N*-deacetylo-4-chloro-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny o wzorze 10



4-chloro-10-demetoksy-10-metylotiokolchicynę (500 mg, 1,11 mmol) rozpuszczono w niewielkiej ilości metanolu (3 ml) i dodano 2 M roztwór kwasu solnego (5 ml), a następnie ogrzewano w temperaturze 90°C przez 96 h. Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej dodano wodny nasycony roztwór NaHCO_3 w celu zobojętnienia. Całość ekstrahowano czterokrotnie CH_2Cl_2 . Połączone warstwy organiczne wysuszono nad MgSO_4 , przesączono i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono przy użyciu chromatografu CombiFlash® stosując kolumnę wypełnioną SiO_2 oraz mieszaninę heksan:octan etylu przy wzrastającym gradiencie stężeń octanu etylu od 50 do 100%.

Otrzymano *N*-deacetylo-4-chloro-10-demetoksy-10-metylotiokolchicynę z wydajnością 58%.

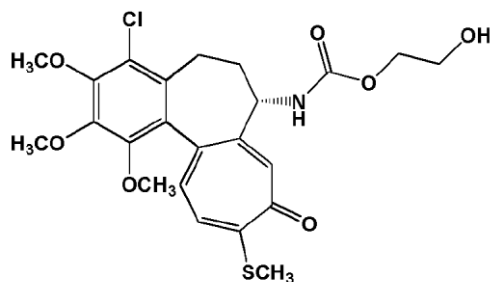
ESI-MS (*m/z*): $[M+H]^+$ 408, $[M+Na]^+$ 430, $[2M+H]^+$ 815, $[2M+Na]^+$ 837.

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 182,4, 158,7, 153,1, 150,1, 149,2, 146,2, 137,0, 134,0, 132,6, 129,8, 129,2, 125,5, 121,8, 61,3, 61,1, 53,5, 38,3, 26,5, 15,1.

^1H NMR (403 MHz, CDCl_3) δ 7,59 (s, 1H), 7,13 (dd, $J = 10,1, 4,8$ Hz, 1H), 7,03 (d, $J = 10,2, 5,1$ Hz, 1H), 3,97 (s, 3H), 3,96 (s, 3H), 3,67-3,60 (m, 4H), 3,22-3,16 (m, 1H), 2,44 (s, 3H), 2,29 (ddd, $J = 17,8, 12,0, 5,9$ Hz, 1H), 2,22-2,12 (m, 1H), 1,69-1,51 (m, 1H).

Przykład 3

Otrzymywanie 2-hydroksyetylo-*N*-karbaminianu-*N*-deacetylo-4-chloro-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny o wzorze 11.



(11)

Do roztworu *N*-deacetylo-4-chloro-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny (100 mg, 0,25 mmol) w tetrahydrofuranie (5 ml) ochłodzonego do temperatury 0°C dodano trietyloaminę (1 ml) oraz trifosgen (77 mg, 0,26 mmol) i mieszano początkowo przez 20 minut w temperaturze 0°C, a następnie zaprzestano chłodzenia i przez kolejne 20 minut mieszano doprowadzając do temperatury pokojowej. Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej dodano glikol etylenowy (0,5 ml) i dalej mieszano w temperaturze pokojowej do czasu zakończenia reakcji, kontrolowanej za pomocą chromatografii TLC. Następnie odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszczono w chlorku metylenu i ekstrahowano roztworem $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ (0,5 M), a następnie wodą. Warstwę organiczną odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono przy użyciu chromatografu CombiFlash® stosując kolumnę wypełnioną SiO_2 oraz mieszaninę heksan:octan etylu przy wzrastającym gradiencie stężeń octanu etylu od 0 do 100%.

Otrzymano 2-hydroksyetylo-*N*-karbaminianu-*N*-deacetylo-4-chloro-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny z wydajnością 45%.

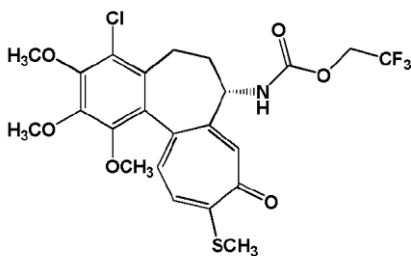
ESI-MS (*m/z*): $[M+H]^+$ 496, $[M+Na]^+$ 518, $[M+K]^+$ 534, $[2M+Na]^+$ 1013.

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 182,5, 159,2, 155,9, 150,7, 150,2, 149,7, 146,6, 137,0, 134,8, 131,8, 129,8, 128,5, 126,3, 122,2, 66,9, 61,5, 61,4, 61,1, 61,1, 53,8, 35,0, 25,9, 15,1.

^1H NMR (403 MHz, CDCl_3) δ 7,43 (s, 1H), 7,27-7,23 (m, 1H), 7,09 (d, $J = 10,5$ Hz, 1H), 6,56 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 4,34 (dt, $J = 13,4, 6,8$ Hz, 1H), 4,09 (dddd, $J = 15,6, 11,7, 8,6, 4,5$ Hz, 2H), 3,99 (s, 3H), 3,98 (s, 3H), 3,69 (t, $J = 4,2, 2\text{H}$), 3,60 (s, 3H), 3,26 (dd, $J = 13,5, 4,8$ Hz, 1H), 2,45 (s, 3H), 2,35-1,80 (m, 4H).

Przykład 4

Otrzymywanie 2,2,2-trifluoroetylo-*N*-karbaminianu-*N*-deacetylo-4-chloro-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny o wzorze 12



(12)

Postępowano jak w przykładzie 3 przy czym zamiast glikolu etylenowego do mieszaniny reakcyjnej dodano 2,2,2-trifluoroetanol (0,5 ml). Po zakończeniu reakcji odsączono wytrącony chlorowodorek

trietyloaminy, przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem i postępowano dalej jak w przykładzie 3.

Otrzymano 2,2,2-trifluoroetylo-*N*-karbaminian-*N*-deacetylo-4-chloro-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny z wydajnością 51%.

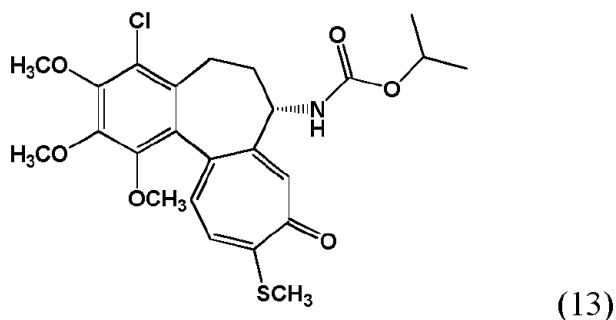
ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ 534, $[M+Na]^+$ 556, $[M+K]^+$ 572, $[2M+Na]^+$ 1089.

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 182,4, 159,5, 153,6, 150,3, 149,7, 146,7, 136,5, 134,8, 131,7, 129,8, 128,6, 126,1, 124,2, 122,3, 121,4, 61,5, 61,3, 61,1, 61,1, 60,7, 54,1, 35,1, 25,9, 15,2.

1H NMR (403 MHz, $CDCl_3$) δ 7,44 (s, 1H), 7,27-7,23 (m, 1H), 7,09 (d, $J = 10,6$ Hz, 1H), 6,55 (s, 1H), 4,53-4,32 (m, 2H), 4,07 (dq, $J = 12,0, 8,1$ Hz, 1H), 3,99 (s, 3H), 3,98 (s, 3H), 3,59 (s, 3H), 3,29 (dd, $J = 13,7, 5,0$ Hz, 1H), 2,45 (s, 3H), 2,39-1,73 (m, 3H).

Przykład 5

Otrzymywanie izopropilo-*N*-karbaminianu-*N*-deacetylo-4-chloro-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny o wzorze 13



Postępowano jak w przykładzie 4 przy czym zamiast 2,2,2-trifluoroetanolu do mieszaniny reakcyjnej dodano izopropanol (0,5 ml).

Otrzymano izopropilo-*N*-karbaminian-*N*-deacetylo-4-chloro-10-demetoksy-10-metylotiokolchicynę z wydajnością 30%.

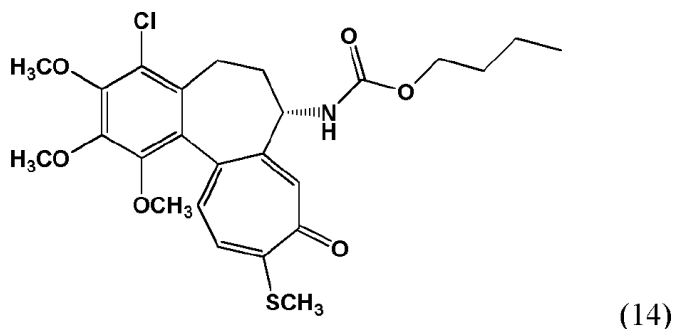
ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ 494, $[M+Na]^+$ 516, $[2M+H]^+$ 987.

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 182,4, 159,2, 155,0, 150,2, 149,9, 149,8, 146,7, 136,5, 134,5, 131,7, 129,9, 128,5, 125,8, 122,1, 68,7, 61,5, 61,1, 53,4, 35,5, 30,9, 25,9, 22,1, 22,1, 15,2.

1H NMR (403 MHz, $CDCl_3$) δ 7,30 (s, 1H), 7,21 (d, $J = 10,4$ Hz, 1H), 7,03 (d, $J = 10,5$, 1H), 5,20 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 4,77 (td, $J = 12,3, 6,1$ Hz, 1H), 4,33 (dt, $J = 13,4, 6,8$ Hz, 1H), 3,98 (s, 3H), 3,97 (s, 3H), 3,61 (s, 3H), 3,29-3,21 (m, 1H), 2,44 (d, $J = 2,8$ Hz, 3H), 2,30-1,65 (m, 3H), 1,18 (dd, $J = 8,6, 6,3$ Hz, 6H).

Przykład 6

Otrzymywanie butylo-*N*-karbaminianu-*N*-deacetylo-4-chloro-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny o wzorze 14



Postępowano jak w przykładzie 4 przy czym zamiast 2,2,2-trifluoroetanolu do mieszaniny reakcyjnej dodano butanol (0,5 ml).

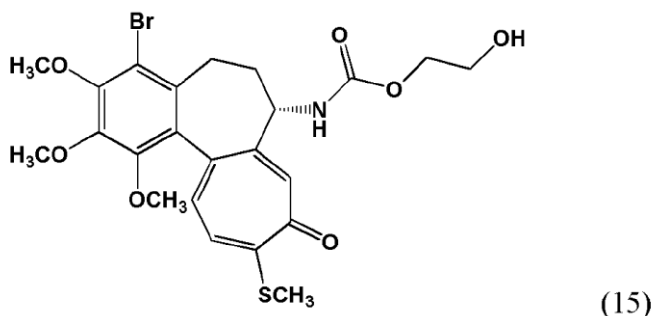
Otrzymano butylo-*N*-karbaminian-*N*-deacetylo-4-chloro-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny z wydajnością 38%.

ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ 508, $[M+Na]^+$ 530, $[2M+H]^+$ 1115, $[2M+Na]^+$ 1037.

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 182,3, 159,2, 155,6, 150,1, 150,0, 149,7, 146,7, 136,5, 134,49, 131,7, 129,9, 128,6, 125,8, 122,1, 65,1, 61,5, 61,4, 61,1, 53,5, 35,4, 30,9, 30,8, 25,9, 19,0, 15,1, 13,6.
 ^1H NMR (403 MHz, CDCl_3) δ 7,33 (s, 1H), 7,22 (d, $J = 10,3$ Hz, 1H), 7,04 (d, $J = 10,5$ Hz, 1H), 5,46 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 4,34 (dt, $J = 13,2, 6,7$ Hz, 1H), 3,99 (s, 3H), 3,97 (s, 3H), 3,62 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H), 3,31-3,22 (m, 1H), 2,44 (d, $J = 2,7$ Hz, 3H), 2,32-2,12 (m, 3H), 1,82-1,69 (m, 2H), 1,59-1,48 (m, 2H), 1,31 (tt, $J = 15,0, 7,7$ Hz, 2H), 0,89 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H).

Przykład 7

Otrzymywanie 2-hydroksyetylo-*N*-karbaminianu-*N*-deacetylo-4-bromo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny o wzorze 15



Do roztworu *N*-deacetylo-4-bromo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny (100 mg, 0,22 mmol) w tetrahydrofuranie (5 ml) ochłodzonego do temperatury 0°C dodano trietyloaminę (1 ml) oraz trifosgen (69 mg, 0,23 mmol) i mieszano początkowo przez 20 minut w temperaturze 0°C , a następnie zaprzestano chłodzenia i przez kolejne 20 minut mieszano doprowadzając do temperatury pokojowej. Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej dodano glikol etylenowy (0,5 ml) i dalej mieszano w temperaturze pokojowej do czasu zakończenia reakcji, kontrolowanej za pomocą chromatografii TLC. Następnie odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszczono w chlorku metylenu i ekstrahowano roztworem $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ (0,5 M), a następnie wodą. Warstwę organiczną odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono przy użyciu chromatografu CombiFlash® stosując kolumnę wypełnioną SiO_2 oraz mieszaninę heksan:octan etylu przy wzrastającym gradiencie stężeń octanu etylu od 0 do 100%.

Otrzymano 2-hydroksyetylo-*N*-karbaminian-*N*-deacetylo-4-bromo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny z wydajnością 50%.

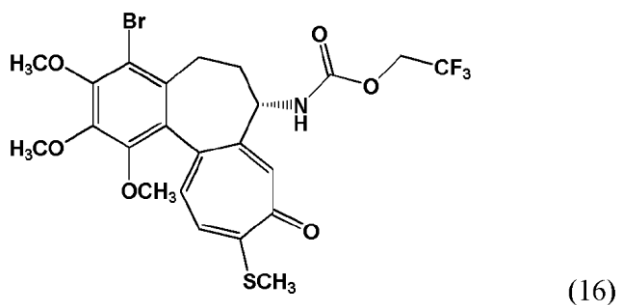
ESI-MS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 540, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 563, $[\text{2M}+\text{H}]^+$ 1101.

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 182,3, 159,2, 156,0, 151,2, 150,6, 150,3, 146,5, 137,0, 134,7, 133,5, 130,0, 128,5, 126,2, 113,5, 66,9, 61,4, 61,1, 61,0, 53,7, 34,9, 29,0, 15,1.

^1H NMR (403 MHz, CDCl_3) δ 7,43 (s, 1H), 7,23 (d, $J = 10,3$ Hz, 1H), 7,07 (d, $J = 10,5$ Hz, 1H), 6,55 (d, $J = 6,9$ Hz, 1H), 4,35-4,27 (m, 1H), 4,10-4,01 (m, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,95 (s, 3H), 3,68-3,63 (m, 2H), 3,59 (s, 3H), 3,29-3,22 (m, 1H), 2,43 (s, 3H), 2,34-2,15 (m, 3H), 1,83 (dd, $J = 10,4, 6,1$ Hz, 1H).

Przykład 8

Otrzymywanie 2,2,2-trifluoroetylo-*N*-karbaminianu-*N*-deacetylo-4-bromo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny o wzorze 16



Postępowano jak w przykładzie 7 przy czym zamiast glikolu etylenowego do mieszaniny reakcyjnej dodano 2,2,2-trifluoroetanol (0,5 ml). Po zakończeniu prowadzenia reakcji odsączono wytrącony chlorowodorek trietyloaminy, przesącz odparowano i postępowano dalej jak w przykładzie 7.

Otrzymano 2,2,2-trifluoroetylo-*N*-karbaminian-*N*-deacetylo-4-bromo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny z wydajnością 30%.

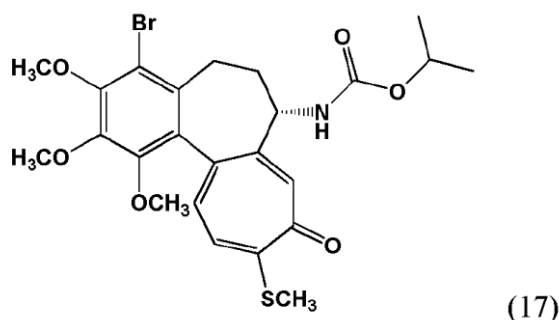
ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ 578, [M+Na]⁺ 600, [2M+H]⁺ 1155, [2M+Na]⁺ 1177.

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 182,3, 159,6, 153,5, 151,3, 150,4, 149,4, 146,7, 136,5, 134,8, 133,3, 129,9, 128,4, 126,0, 124,2, 121,4, 113,6, 61,5, 61,2, 61,1, 61,0, 60,8, 54,0, 35,1, 28,9, 15,2.

¹H NMR (403 MHz, CDCl₃) δ 7,37 (s, 1H), 7,22 (d, *J* = 10,3 Hz, 1H), 7,06 (d, *J* = 10,6 Hz, 1H), 6,18 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 4,48 (dq, *J* = 12,6, 8,5 Hz, 1H), 4,37-4,29 (m, 1H), 4,17-4,07 (m, 1H), 3,98 (s, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,59 (s, 3H), 3,29 (dd, *J* = 13,2, 4,3 Hz, 1H), 2,44 (s, 3H), 2,36-2,23 (m, 2H), 1,82 (dt, *J* = 11,0, 4,7 Hz, 1H).

Przykład 9

Otrzymywanie izopropilo-*N*-karbaminianu-*N*-deacetylo-4-bromo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny o wzorze 17



Postępowano jak w przykładzie 8 przy czym zamiast 2,2,2-trifluoroetanolu do mieszaniny reakcyjnej dodano izopropanol (0,5 ml).

Otrzymano izopropilo-*N*-karbaminian-*N*-deacetylo-4-bromo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny z wydajnością 32%.

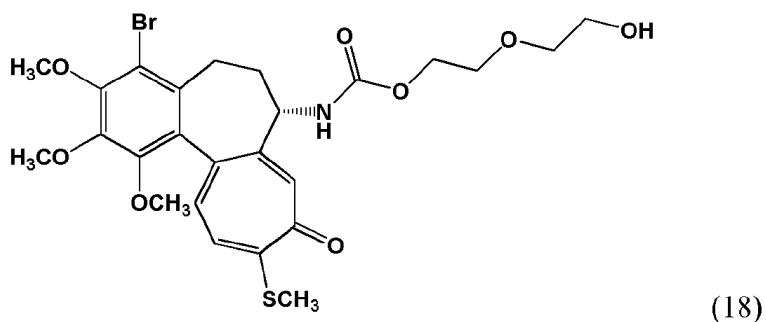
ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ 560, [2M+H]⁺ 1097.

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 182,4, 159,2, 155,0, 151,1, 150,4, 149,9, 146,6, 136,6, 134,5, 133,4, 130,1, 128,5, 125,8, 113,5, 68,7, 61,5, 61,4, 61,0, 53,3, 35,4, 29,0, 22,1, 22,1, 15,1.

¹H NMR (403 MHz, CDCl₃) δ 7,29 (s, 1H), 7,19 (d, *J* = 10,3 Hz, 1H), 7,02 (d, *J* = 10,4 Hz, 1H), 5,15 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 4,77 (dp, *J* = 12,5, 6,2 Hz, 1H), 4,35-4,26 (m, 1H), 3,97 (s, 3H), 3,95 (s, 3H), 3,60 (s, 3H), 3,29-3,23 (m, 1H), 2,43 (s, 3H), 2,25 (dd, *J* = 7,3, 3,9 Hz, 2H), 1,64 (dd, *J* = 11,5, 5,6 Hz, 1H), 1,17 (dd, *J* = 8,9, 6,3 Hz, 6H).

Przykład 10

Otrzymywanie 2-(2-hydroksoetoksy)etylo-*N*-karbaminianu-*N*-deacetylo-4-bromo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny o wzorze 18



Postępowano jak w przykładzie 7 przy czym zamiast glikolu etylenowego do mieszaniny reakcyjnej dodano glikol dietylenowy (0,5 ml).

Otrzymano 2-(2-hydroksoetoksy)etylo-*N*-karbaminian-*N*-deacetylo-4-bromo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny z wydajnością 38%.

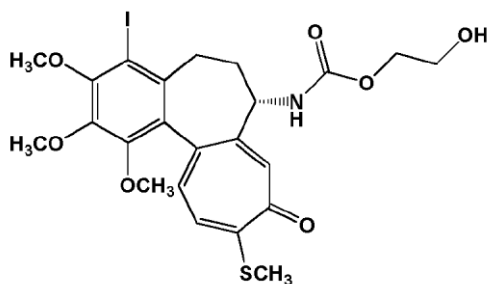
ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ 584, $[M+Na]^+$ 606, $[2M+Na]^+$ 1189.

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 182,4, 159,3, 155,4, 151,2, 150,4, 150,2, 146,6, 136,8, 134,7, 133,4, 130,0, 128,3, 126,1, 113,5, 72,4, 69,1, 64,2, 61,5, 61,4, 61,0, 53,7, 34,9, 28,9, 15,2.

1H NMR (403 MHz, $CDCl_3$) δ 7,36 (s, 1H), 7,22 (d, $J = 10,3$ Hz, 1H), 7,06 (d, $J = 10,6$ Hz, 1H), 5,97 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 4,35-4,20 (m, 2H), 4,13-4,06 (m, 1H), 3,98 (s, 3H), 3,96 (s, 3H), 3,79-3,70 (m, 2H), 3,64 (t, $J = 4,6$ Hz, 2H), 3,60 (s, 3H), 3,57 (dd, $J = 5,3, 4,4$ Hz, 2H), 3,27 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 2,44 (s, 3H), 2,27 (dd, $J = 6,6, 3,5$ Hz, 2H), 1,80-1,71 (m, 2H).

Przykład 11

Otrzymywanie 2-hydroksyetylo-*N*-karbaminianu-*N*-deacetylo-4-jodo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny o wzorze 19



(19)

Do roztworu *N*-deacetylo-4-jodo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny (100 mg, 0,20 mmol) w tetrahydrofuranie (5 ml) ochłodzonego do temperatury 0°C dodano trietyloaminę (1 ml) oraz trifosgen (62 mg, 0,21 mmol) i mieszano początkowo przez 20 minut w temperaturze 0°C, a następnie zaprzestano chłodzenia i przez kolejne 20 minut mieszano doprowadzając do temperatury pokojowej. Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej dodano glikol etylenowy (0,5 ml) i dalej mieszano w temperaturze pokojowej do czasu zakończenia reakcji kontrolowanej za pomocą chromatografii TLC. Następnie odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszczono w chlorku metylenu i ekstrahowano roztworem $HCl_{(aq)}$ (0,5 M), a następnie wodą. Warstwę organiczną odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono przy użyciu chromatografu CombiFlash® stosując kolumnę wypełnioną SiO_2 oraz mieszaninę heksan:octan etylu przy wzrastającym gradiencie stężeń octanu etylu od 0 do 100%.

Otrzymano 2-hydroksyetylo-*N*-karbaminian-*N*-deacetylo-4-jodo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny z wydajnością 36%.

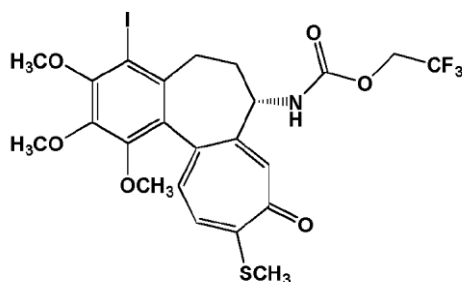
ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ 588, $[M+Na]^+$ 610, $[2M+H]^+$ 1175, $[2M+Na]^+$ 1197.

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 182,4, 159,2, 155,9, 153,5, 151,4, 150,4, 145,5, 137,3, 136,8, 134,6, 129,5, 128,5, 126,2, 92,2, 66,9, 61,4, 61,3, 61,2, 60,8, 53,7, 34,9, 34,5, 15,2.

1H NMR (403 MHz, $CDCl_3$) δ 7,36 (s, 1H), 7,16 (d, $J = 10,3$ Hz, 1H), 7,01 (d, $J = 10,5$ Hz, 1H), 6,32 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 4,27-4,19 (m, 1H), 4,00 (dd, $J = 7,7, 3,8$ Hz, 2H), 3,90 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 3,63-3,58 (m, 2H), 3,53 (s, 3H), 3,12 (dd, $J = 13,7, 4,8$ Hz, 1H), 2,42-2,32 (m, 4H), 2,28-2,18 (m, 1H), 2,11 (s, 1H), 1,77-1,66 (m, 1H).

Przykład 12

Otrzymywanie 2,2,2-trifluoroetylo-*N*-karbaminianu-*N*-deacetylo-4-jodo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny o wzorze 20



(20)

Postępowano jak w przykładzie 11 przy czym zamiast glikolu etylenowego do mieszaniny reakcyjnej dodano 2,2,2-trifluoroetanol (0,5 ml). Po zakończeniu prowadzenia reakcji odsączono wytrącony chlorowodorek trietyloaminy, przesącz odparowano i postępowano dalej jak w przykładzie 11.

Otrzymano 2,2,2-trifluoroctylo-*N*-karbaminian-*N*-deacetylo-4-jodo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny z wydajnością 27%.

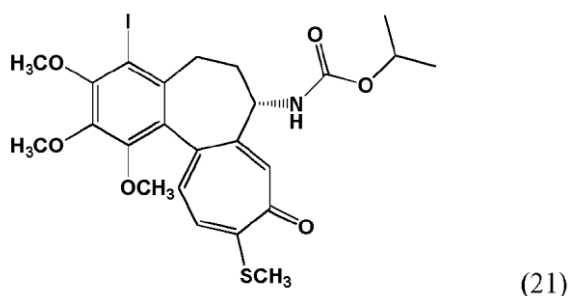
ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ 626, $[M+Na]^+$ 648.

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 182,3, 159,5, 153,6, 153,6, 151,4, 149,4, 145,6, 136,9, 136,6, 134,6, 129,5, 128,4, 126,0, 124,2, 121,4, 92,2, 61,4, 61,2, 61,2, 60,8, 53,9, 35,0, 34,4, 15,2.

1H NMR (403 MHz, $CDCl_3$) δ 7,36 (d, $J = 6,3$ Hz, 1H), 7,21 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 7,06 (d, $J = 10,4$ Hz, 1H), 6,27-6,06 (m, 1H), 4,49 (ddd, $J = 16,9, 12,6, 8,5$ Hz, 1H), 4,31 (dt, $J = 11,8, 6,8$ Hz, 1H), 4,19-4,09 (m, 1H), 3,97 (s, 3H), 3,96 (s, 3H), 3,59 (s, 3H), 3,21 (dd, $J = 13,8, 4,8$ Hz, 1H), 2,51-2,27 (m, 5H), 1,85-1,62 (m, 1H).

Przykład 13

Otrzymywanie izopropylo-*N*-karbaminianu-*N*-deacetylo-4-jodo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny o wzorze 21



Postępowano jak w przykładzie 12 przy czym zamiast 2,2,2-trifluoroetanolu do mieszaniny reakcyjnej dodano izopropanol (0,5 ml).

Otrzymano izopropylo-*N*-karbaminian-*N*-deacetylo-4-jodo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny z wydajnością 33%.

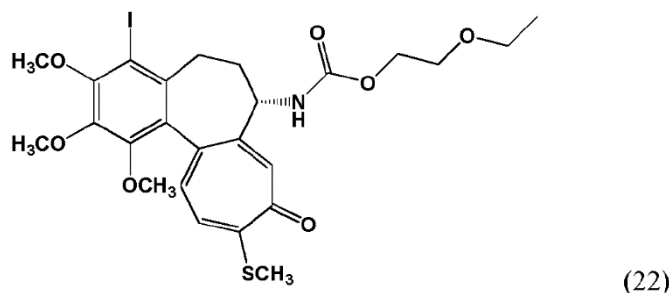
ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ 586, $[M+Na]^+$ 608.

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 182,4, 159,2, 155,0, 153,4, 151,4, 149,9, 145,6, 136,9, 136,7, 134,3, 129,6, 128,4, 125,8, 92,1, 68,7, 61,4, 61,3, 60,8, 53,3, 35,3, 34,5, 22,1, 22,1, 15,2.

1H NMR (403 MHz, $CDCl_3$) δ 7,29 (s, 1H), 7,18 (d, $J = 10,3$ Hz, 1H), 7,04-7,00 (m, 1H), 5,15 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 4,77 (dt, $J = 12,5, 6,2$ Hz, 1H), 4,34-4,23 (m, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 3,60 (s, 3H), 3,20-3,13 (m, 1H), 2,43 (s, 3H), 2,40-1,56 (m, 3H), 1,18 (dd, $J = 9,1, 6,3$ Hz, 6H).

Przykład 14

Otrzymywanie 2-etoksyetylo-*N*-karbaminianu-*N*-deacetylo-4-jodo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny o wzorze 22



Postępowano jak w przykładzie 11 przy czym zamiast glikolu etylenowego do mieszaniny reakcyjnej dodano 2-etoksyetanol (0,5 ml).

Otrzymano 2-etoksyetylo-*N*-karbaminian-*N*-deacetylo-4-bromo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny z wydajnością 29%.

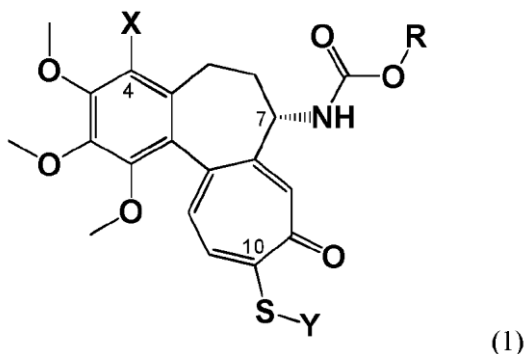
ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ 616, $[M+Na]^+$ 638.

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 182,3, 159,3, 155,2, 153,5, 151,4, 149,6, 145,6, 136,8, 136,7, 134,4, 129,6, 128,5, 125,7, 92,1, 68,5, 66,6, 64,5, 61,4, 60,8, 53,4, 35,2, 34,4, 30,9, 15,2, 15,0.

^1H NMR (403 MHz, CDCl_3) δ 7,30 (s, 1H), 7,18 (d, $J = 10,3$ Hz, 1H), 7,02 (d, $J = 10,7$ Hz, 1H), 5,39-5,33 (m, 1H), 4,32-4,24 (m, 1H), 4,14 (tdd, $J = 11,7, 8,1, 3,6$ Hz, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,95 (s, 3H), 3,60 (d, $J = 2,8$ Hz, 6H), 3,59-3,48 (m, 4H), 3,18 (dd, $J = 13,8, 4,7$ Hz, 2H), 2,47-2,42 (m, 3H), 2,33-2,19 (m, 2H), 1,37-1,11 (m, 3H).

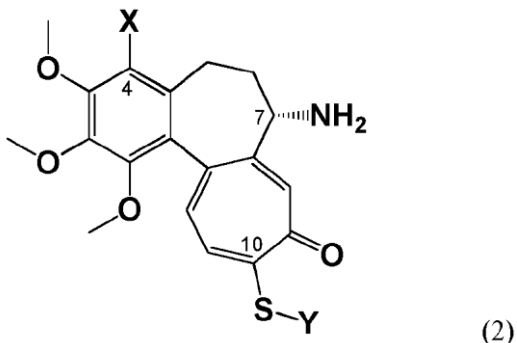
Zastrzeżenia patentowe

1. *N*-karbaminianowe pochodne *N*-deacetylo-4-(bromo/chloro/jodo)-10-demetoksy-10-alkiliotiokolchicyny o wzorze ogólnym 1



gdzie:

- X oznacza Cl, Br lub I;
 - Y oznacza grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 4 atomów węgla;
 - R oznacza:
 - grupę alkilową prostą lub rozgałęziającą zawierającą od 1 do 10 atomów węgla,
 - grupę alkilową prostą zawierającą od 1 do 5 atomów węgla podstawioną w dowolnej pozycji łańcucha od 1 do 3 atomami halogenu, które mogą znajdować się zarówno przy tym samym jak i przy różnych atomach węgla,
 - grupę alkilową prostą zawierającą od 1 do 5 atomów węgla podstawioną w pozycji terminalnej grupą hydroksylową,
 - grupę alkilową prostą zawierającą od 2 do 10 atomów węgla zawierającą w dowolnej pozycji łańcucha wiązania eterowe,
 - grupę alkilową prostą zawierającą od 2 do 10 atomów węgla zawierającą grupę hydroksylową przy terminalnym atomie węgla oraz w dowolnej pozycji łańcucha wiązania eterowe.
2. Sposób otrzymywania nowych *N*-karbaminianów *N*-deacetylo-4-(bromo/chloro/jodo)-10-demetoksy-10-alkiliotiokolchicyny o wzorze ogólnym 1, w którym X, R i Y mają znaczenie podane w zastrzeżeniu 1, **znamienny tym**, że polega na reakcji pomiędzy związkiem o wzorze ogólnym 2,

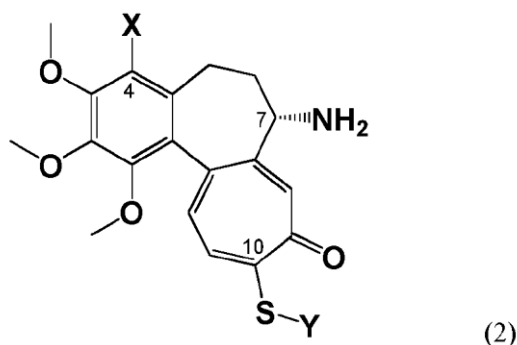


w którym X i Y mają wyżej podane znaczenie z alkoholem o wzorze ogólnym 3,

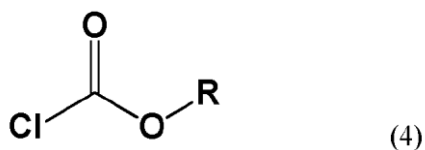


w którym R ma wyżej podane znacznie w obecności trifosgeny, jako aktywatora oraz aminy alifatycznej.

3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że reakcje prowadzi się w rozpuszczalniku apolarnym chloroalifatycznym, aromatycznym lub w tetrahydrofuranie.
4. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że reakcje prowadzi się w chloroformie, chlorku metylenu, toluenie, benzenie, tetrahydrofuranie.
5. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że reakcje prowadzi się w obecności tributyloaminy lub tripropyloaminy lub triizobutyloaminy lub triizopropyloaminy lub diizopropyloaminy lub *N,N*-diizopropyletyloaminy lub trietyloaminy, najkorzystniej w obecności trietyloaminy.
6. Sposób otrzymywania *N*-karbaminianów *N*-deacetylo-4-(bromo/chloro/jodo)-10-demetoksy--10-alkilotiokolchicyny o wzorze ogólnym 1, w którym X, R i Y mają znaczenie podane w zastrzeżeniu 1, **znamienny tym**, że polega na reakcji pomiędzy związkiem o wzorze ogólnym 2.



w którym X i Y mają wyżej podane znaczenia a odpowiednim chloromrówczanem o wzorze ogólnym 4,

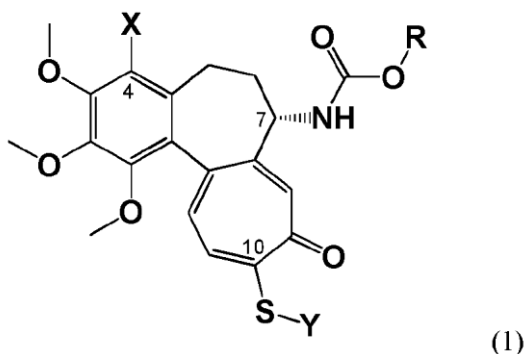


gdzie R oznacza:

- grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 10 atomów węgla,
- grupę alkilową prostą zawierającą od 1 do 5 atomów węgla podstawioną w dowolnej pozycji łańcucha od 1 do 3 atomami halogenu, które mogą znajdować się zarówno przy tym samym jak i przy różnych atomach węgla,
- grupę alkilową prostą zawierającą od 2 do 10 atomów węgla zawierającą w dowolnej pozycji łańcucha wiązania eterowe,

w obecności aminy alifatycznej.

7. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że reakcje prowadzi się w rozpuszczalniku aprotycznym chloroalifatycznym, acetonitrylu lub tetrahydrofuranie.
8. Sposób według zastrz. 7, **znamienny tym**, że reakcje prowadzi się w chloroformie, chlorku metylenu, acetonitrylu lub tetrahydrofuranie.
9. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że reakcje prowadzi się w obecności tributyloaminy lub tripropyloaminy lub triizobutyloaminy lub triizopropyloaminy lub diizopropyloaminy lub *N,N*-diizopropyletyloaminy lub trietyloaminy, najkorzystniej w obecności trietyloaminy.
10. Zastosowanie *N*-karbaminianowych pochodnych *N*-deacetylo-4-(bromo/chloro/jodo)-10-demetoksy-10-alkilotiokolchicyny o wzorze ogólnym 1



gdzie:

- X oznacza Cl, Br lub I;
- Y oznacza grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 4 atomów węgla;
- R oznacza:
 - grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 10 atomów węgla,
 - grupę alkilową prostą zawierającą od 1 do 5 atomów węgla podstawioną w dowolnej pozycji łańcucha od 1 do 3 atomami halogenu, które mogą znajdować się zarówno przy tym samym jak i przy różnych atomach węgla,
 - grupę alkilową prostą zawierającą od 1 do 5 atomów węgla podstawioną w pozycji terminalnej grupą hydroksylową,
 - grupę alkilową prostą zawierającą od 2 do 10 atomów węgla zawierającą w dowolnej pozycji łańcucha wiązania eterowe,
 - grupę alkilową prostą zawierającą od 2 do 10 atomów węgla zawierającą grupę hydroksylową przy terminalnym atomie węgla oraz w dowolnej pozycji łańcucha wiązania eterowe,

do przygotowania preparatów leczniczych stosowanych w terapii przeciwnowotworowej.

11. Zastosowanie według zastrz. 10, **znamiennie tym**, że *N*-karbaminianowe pochodne *N*-deacetylo-4-(bromo/chloro/jodo)-10-demetoksy-10-alkilotiokolchicyny są użyte do sporządzania leków przydatnych w chemioterapii ludzkiego gruczolaka płuc.
12. Zastosowanie według zastrz. 10, **znamiennie tym**, że *N*-karbaminianowe pochodne *N*-deacetylo-4-(bromo/chloro/jodo)-10-demetoksy-10-alkilotiokolchicyny są użyte do sporządzania leków przydatnych w chemioterapii ludzkiego gruczolaka piersi.
13. Zastosowanie według zastrz. 10, **znamiennie tym**, że *N*-karbaminianowe pochodne *N*-deacetylo-4-(bromo/chloro/jodo)-10-demetoksy-10-alkilotiokolchicyny są użyte do sporządzania leków przydatnych w chemioterapii ludzkiego gruczolaka jelita grubego.
14. Zastosowanie według zastrz. 10, **znamiennie tym**, że *N*-karbaminianowe pochodne *N*-deacetylo-4-(bromo/chloro/jodo)-10-demetoksy-10-alkilotiokolchicyny są użyte do sporządzania leków przydatnych w chemioterapii ludzkiego gruczolaka jelita grubego wrażliwego na doksorubicynę.
15. Zastosowanie według zastrz. 10, **znamiennie tym**, że *N*-karbaminianowe pochodne *N*-deacetylo-4-(bromo/chloro/jodo)-10-demetoksy-10-alkilotiokolchicyny są użyte do sporządzania leków przydatnych w chemioterapii ludzkiego gruczolaka jelita grubego opornego na doksorubicynę.

