

## Pochodne kolchicyny, sposób ich wytwarzania i zastosowanie.

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

- 5           Chemiczna modyfikacja związków pochodzenia naturalnego, wykazujących aktywność biologiczną, jest obecnie jedną z najbardziej efektywnych metod poszukiwania nowych leków. Kolchicyna - pseudoalkaloid izolowany głównie z *Colchicum autumnale* i *Gloriosa superba* jest dobrze znanym czynnikiem antymitotycznym oraz przeciwzapalnym. W testach *in vivo* wykazuje dobre właściwości cytostatyczne. Mechanizm działania cytostatycznego kolchicyny
- 10           polega na wiązaniu się jej z tubuliną w kolchicynowym miejscu wiążącym tubuliny, czego skutkiem jest zablokowanie mitozy (podziału komórki). Powstawanie trwałego kompleksu kolchicyna - 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
- 15           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
- 20           komórkowych A549 (ludzki gruczolak płuc) 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  
25 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  
30 stosunku do linii komórkowej A549 (ludzki gruczolak płuc) oraz porównywalną cytotoksycznością jak niemodyfikowana kolchicyna 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  
35 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  
40 cytotoksyczności dla tego typu pochodnych.

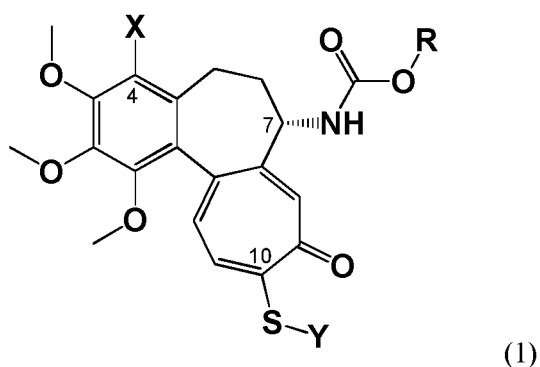
Kerekes i współpracownicy opisali badania nad pochodnymi kolchicyny modyfikowanymi w pozycji C-7 i C-10 [P. Kerekes *et al.* *J Med Chem*, 1985, 28, 1204-1208]. Badania cytotoksyczności otrzymanych związków prowadzono *in vivo* na myszach z myszą nowotworową linią komórkową P388 (mysia białaczka). Dla przebadanych pochodnych  
45 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 nowotworowych. Organizm myszy istotnie różni się od

50 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.

60 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.

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



gdzie:

- X oznacza Cl, Br lub I;
- 70 - 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,

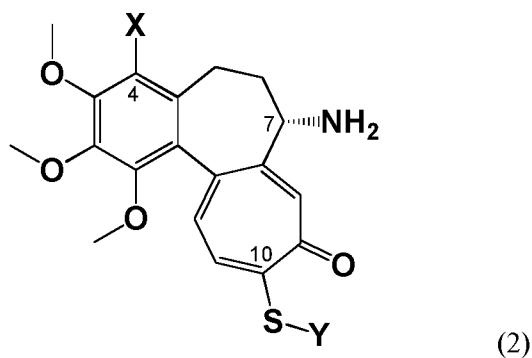
75

- 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.

80

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

85



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

90



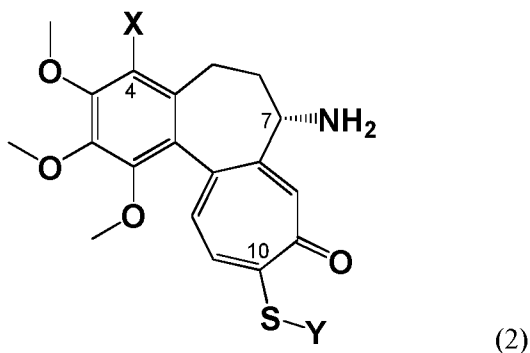
w którym R ma wyżej podane znaczenie w obecności trifosgeny, jako aktywatora oraz aminy alifatycznej.

Reakcję prowadzi się w rozpuszczalniku apolarnym chloroalifatycznym, aromatycznym lub w tetrahydrofuranie, korzystnie w chloroformie, chlorku metylenu, toluenie, benzenie,

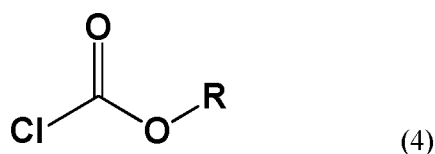
95 tetrahydrofuranie. Korzystne jest prowadzenie reakcji w warunkach bezwodnych. Jako aminę alifatyczną stosuje się korzystnie tributylloaminę, tripropyloaminę, triizobutyloaminę, triizopropyloaminę, diizopropyloaminę, *N,N*-dizopropylloaminę, trietyloaminę, najkorzystniej trietyloaminę. Aminy kompleksują powstający w wyniku rozpadu trifosgeny produkt uboczny – chlorowódor. Wiązanie chlorowodoru przez aminę zapobiega zachodzeniu  
100 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°C. Aktywacja związku o wzorze 2 w obniżonej temperaturze trwa na ogół od 10 do 30 minut. Po  
105 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.

110 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  
115 przy użyciu chromatografii kolumnowej, korzystnie przy użyciu chromatografu CombiFlash® stosując kolumnę wypełnioną  $\text{SiO}_2$  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*-  
120 karbaminianów *N*-deacetylo-4-(bromo/chloro/jodo)-10-demetoksy-10-alkilolio-kolchicyny o wzorze ogólnym 1, w którym X, R i Y mają wyżej podane znaczenie w reakcji pomiędzy związkiem o wzorze ogólnym 2.



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



gdzie R oznacza:

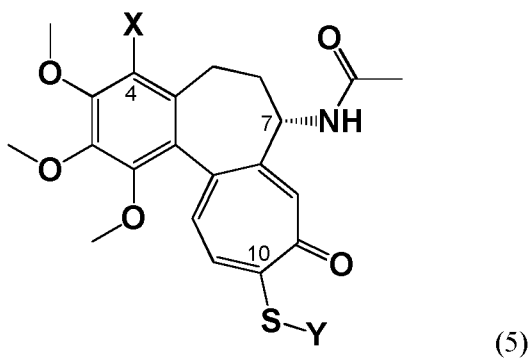
- grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 10 atomów węgla,
- grupę alkilową prostą zawierającą od 1 do 5 atomów węgla podstawioną w dowolnej
- 130 pozycji łańcucha od 1 do 3 atomami halogenu, które mogą znajdować się zarówno przy tym samym jak i przy różnych atomach węgla,
- grupę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

w obecności aminy alifatycznej.

135 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 tributylloaminę, tripropyloaminę, triizobutyloaminę, triizopropyloaminę, diizopropyloaminę, *N,N*-dizopropyloetyloaminę, trietyloaminę,

140 najkorzystniej trietyloaminę.

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



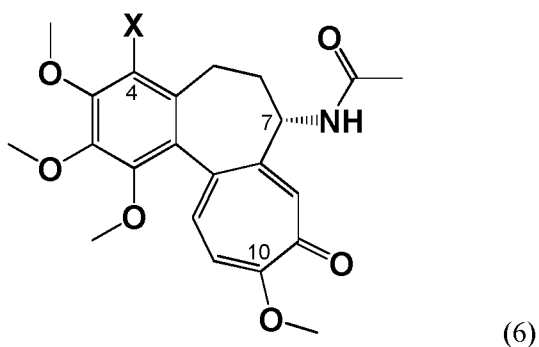
w którym X i Y mają wyżej podane znaczenie, w wyniku jego deacetylacji pod wpływem roztworu kwasu nieorganicznego

145

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.

150

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



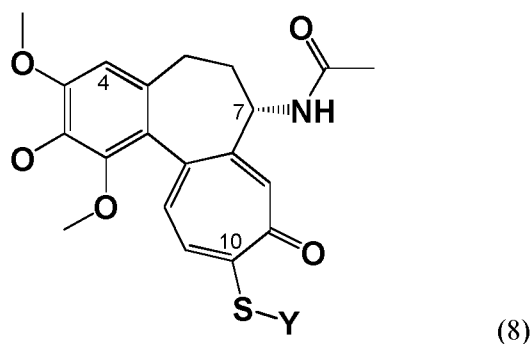
155 w reakcji z alkilotioianem o wzorze ogólnym 7



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.

160 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,
- 165 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, 170 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 175 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,
- 180 - 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.

Tabela 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

195

200

Tabela 2.

Nazwa	Producent
Medium hodowlane dla linii A-549	<ul style="list-style-type: none"> <li>• OptiMEM+RPMI1640 (1:1) (PChO, IITD PAN, Wrocław)</li> <li>• 5% FBS HyClone (GE Healthcare, USA),</li> <li>• 2 mM L-Glutamina (Sigma Aldrich, Niemcy)</li> <li>• 0,1 mg/ml streptomycyna, 100 U/ml penicylina (odpowiednio: Sigma Aldrich, Niemcy i Polfa Tarchomin, Polska)</li> </ul>
Medium hodowlane dla linii MCF-7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eagle medium (PChO, IITD PAN, Wrocław)</li> <li>• 10% FBS (Sigma-Aldrich, Niemcy)</li> <li>• 2 mM L-Glutamina (Sigma-Aldrich, Niemcy)</li> <li>• 8 µg/mL insulina (Sigma-Aldrich, Niemcy)</li> <li>• 1 % aminokwasy (Sigma-Aldrich, Niemcy)</li> <li>• 0,1 mg/ml streptomycyna, 100 U/ml penicylina (odpowiednio: Sigma Aldrich, Niemcy i Polfa Tarchomin, Polska)</li> </ul>
Medium hodowlane dla linii LoVo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• OptiMEM+RPMI1640 (1:1) (PChO, IITD)</li> <li>• 5% FBS HyClone (GE Healthcare, USA),</li> <li>• 2 mM L-Glutamina (Sigma Aldrich, Niemcy)</li> <li>• 1 mM pirogronian sodu (Sigma Aldrich, Niemcy)</li> <li>• 0,1 mg/ml streptomycyna, 100 U/ml penicylina (odpowiednio: Sigma Aldrich, Niemcy i Polfa Tarchomin, Polska)</li> </ul>
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	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dulbecco medium (Gibco, UK)</li> <li>• 10 % FBS HyClone (GE Healthcare, USA)</li> <li>• 2 mM L-Glutamina (Sigma Aldrich, Niemcy)</li> <li>• 0,1 mg/ml streptomycyna, 100 U/ml penicylina (odpowiednio: Sigma Aldrich, Niemcy i Polfa Tarchomin, Polska)</li> </ul>
Medium hodowlane do rozcieńczeń związków	<ul style="list-style-type: none"> <li>• OptiMEM+RPMI1640 (1:1) (PChO, IITD PAN, Wrocław)</li> <li>• 5% FBS HyClone (GE Healthcare, USA),</li> <li>• 2mM L-Glutamina (Sigma Aldrich, Niemcy)</li> <li>• 0,1 mg/ml streptomycyna, 100 U/ml penicylina (odpowiednio: Sigma Aldrich, Niemcy i Polfa Tarchomin, Polska)</li> </ul>
10mM TRIS	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Woda dejonizowana ogólnolaboratoryjna niejałowa</li> <li>2. TRIZMA BASE (Sigma-Aldrich, Niemcy)</li> </ol>
1% kwas octowy	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Woda dejonizowana ogólnolaboratoryjna niejałowa</li> <li>2. Kwas octowy 80% CZDA (POCH SA, Gliwice)</li> </ol>
0,1 % roztwór sulforodaminy B (SRB)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sulforhodamine B sodium salt (Sigma-Aldrich, Niemcy)</li> <li>2. 1% kwas octowy</li> </ol>
50% kwas trójchlorooctowy (TCA)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Woda dejonizowana ogólnolaboratoryjna niejałowa</li> <li>2. Kwas trichlorooctowy CZDA (POCH SA, Gliwice)</li> </ol>
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.

205 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 210 ilości białka komórkowego. W każdym doświadczeniu próbki zawierające określone stężenia preparatu nanoszono na płytki 96-dolkowe w trzech powtórzeniach. Doświadczenia powtarzano minimum trzy razy.

a) Komórki (pochodzące z hodowli *in vitro*) nanoszono do dołków płytki w liczbie  $1 \times 10^4$  w przypadku linii LoVo, LoVo/DX, MCF-7 oraz BALB3T3 lub  $0,5 \times 10^4$  dla linii A549 220 komórek w 100 µl medium hodowlanego danej linii komórkowej, a następnie inkubowano w 37°C, w wilgotnej atmosferze (60-90%) nasyconej 5% CO<sub>2</sub>.

b) 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 225 przeznaczonych na kontrolę medium bez komórek dodano 100 µl samego medium hodowlanego, stosowanego w przypadku związków do ich rozcieńczeń.

c) Płytki inkubowano przez kolejne 72 godziny w inkubatorze (37°C, w wilgotnej atmosferze (60-90%) nasyconej 5% CO<sub>2</sub>).

d) Po zakończeniu inkubacji komórek ze związkami wykonywano test SRB.

230 e) 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:

235 Po upływie czasu inkubacji testu do każdego dołka dodano po 50  $\mu$ l 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  $\mu$ l 0,1 % roztworu sulforodaminy B (SRB) w 1% kwasie octowym w celu wybarwienia strąconego w dołku białka komórkowego. Po 30-minutowej  
240 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  $\mu$ l 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,  
245 Winooski VT, USA.

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

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

250 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.

255 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 IC<sub>50</sub> według metody opisanej w D. Nevozhay *et al.*, *Plos One* 2014, 9:10. Następnie, z kolejnych 3-5 powtórzeń testu, wyliczano  
260 średnią wartość IC<sub>50</sub> i odchylenie standardowe.

Dla wszystkich badanych pochodnych wyznaczono wskaźnik IC<sub>50</sub>, 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  
265 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  
270 współczynnikami selektywności (*SI*). *SI* > 1,0 wskazuje, że związek wykazuje wyższą skuteczność oddziaływania na komórki nowotworowe niż toksyczność w stosunku do komórek zdrowych.

Tabela 3

Związek	A549		MCF-7		LoVo		LoVo/DX			BALB/3T3
	IC <sub>50</sub> [μM]	SI	IC <sub>50</sub> [μM]	SI	IC <sub>50</sub> [μM]	SI	IC <sub>50</sub> [μM]	SI	RI	IC <sub>50</sub> [μM]
Kolchicyna	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

275

Wartość IC<sub>50</sub> – stężenie związku, które odpowiada 50% hamowaniu wzrostu komórek nowotworowych;

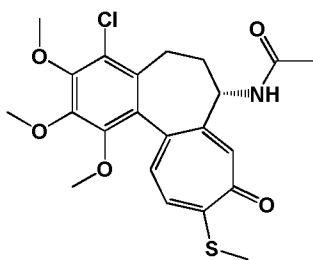
Indeks RI (*Resistance Index*):  $RI = IC_{50} \text{ LoVo/DX} / IC_{50} \text{ LoVo}$ ;

280 Indeks SI (*Selectivity Index*) = IC<sub>50</sub> dla normalnej linii komórkowej (BALB/3T3) / IC<sub>50</sub> dla poszczególnych linii komórek nowotworowych.

Wynalazek ilustrują przykłady

Przykład 1

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



(9)

285

### 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  
 290 destylowaną (150 ml). Całość ekstrahowano czterokrotnie  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Połączone warstwy organiczne wysuszono nad  $\text{MgSO}_4$ , przesączono i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono przy użyciu chromatografu CombiFlash® stosując kolumnę wypełnioną  $\text{SiO}_2$  oraz mieszaninę octan etylu:metanol przy wzrastającym gradiencie stężeń metanolu od 0 do 50%.

295 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  
 300 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  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Połączone warstwy organiczne wysuszono nad  $\text{MgSO}_4$ , przesączono i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono przy użyciu chromatografu CombiFlash® stosując kolumnę wypełnioną  $\text{SiO}_2$  oraz mieszaninę octan etylu:metanol przy wzrastającym gradiencie stężeń metanolu od 0 do 50%.

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

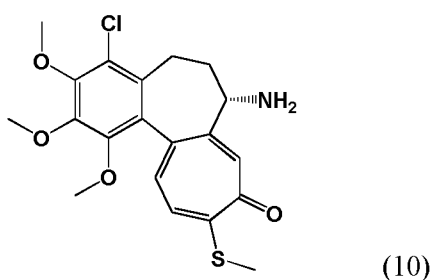
ESI-MS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  450,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  472,  $[\text{2M}+\text{H}]^+$  889,  $[\text{2M}+\text{Na}]^+$  921.

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  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.

<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,98 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 7,44 (s, 1H), 7,29 – 7,24 (m, 1H), 7,08  
310 (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

315 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  
320 wodny nasycony roztwór NaHCO<sub>3</sub> w celu zobojętnienia. Całość ekstrahowano czterokrotnie  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Połączone warstwy organiczne wysuszone nad MgSO<sub>4</sub>, przesączono i odparowano pod  
zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono przy użyciu chromatografu CombiFlash®  
stosując kolumnę wypełnioną SiO<sub>2</sub> oraz mieszaninę heksan:octan etylu przy wzrastającym  
gradientcie stężeń octanu etylu od 50 do 100%.

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

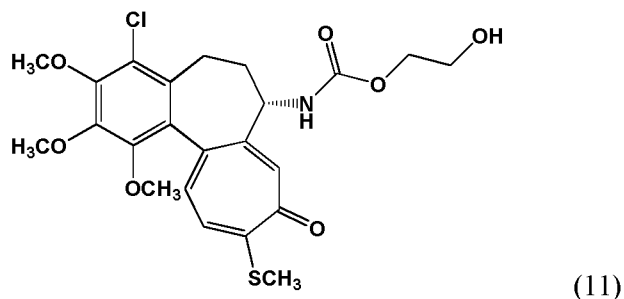
ESI-MS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup> 408, [M+Na]<sup>+</sup> 430, [2M+H]<sup>+</sup> 815, [2M+Na]<sup>+</sup> 837.

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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.

<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,59 (s, 1H), 7,13 (dd, *J* = 10,1, 4,8 Hz, 1H), 7,03 (dd, *J* = 10,2,  
330 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

O t r z y m y w a n i e 2-hydroksyetylo-*N*-karbaminianu-*N*-deacetylo-4-chloro-10-demetoksy-10-  
335 metylotiolcolchicyny o wzorze 11.



Do roztworu *N*-deacetylo-4-chloro-10-demetoksy-10-metylotiolcolchicyny (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  
340 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<sub>(aq)</sub>  
345 (0,5 M), a następnie wodą. Warstwę organiczną odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono przy użyciu chromatografu CombiFlash® stosując kolumnę wypełnioną SiO<sub>2</sub> oraz mieszaninę heksan:octan etylu przy wzrastającym gradiencie stężeń octanu etylu od 0 do 100%.

Otrzymano 2-hydroksyetylo-*N*-karbaminian-*N*-deacetylo-4-chloro-10-demetoksy-10-metylotio-  
350 kolchicyny z wydajnością 45%.

ESI-MS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> 496, [M+Na]<sup>+</sup> 518, [M+K]<sup>+</sup> 534, [2M+Na]<sup>+</sup> 1013.

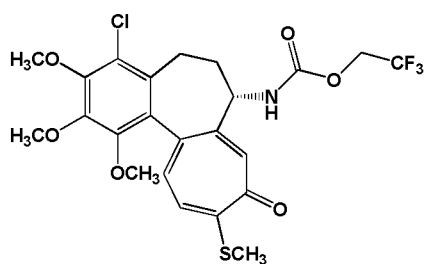
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 182,5, 159,2, 155,9, 150,7, 150,2, 149,7, 146,6, 137,0, 134,8, 131,8, 129,8, 128,5, 126,3, 122,2, 66,9, 61,5, 61,4, 61,1, 61,1, 53,8, 35,0, 25,9, 15,1.

<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,43 (s, 1H), 7,27 – 7,23 (m, 1H), 7,09 (d, *J* = 10,5 Hz, 1H), 6,56  
355 (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,  $J = 4,2$  Hz, 2H), 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



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%.

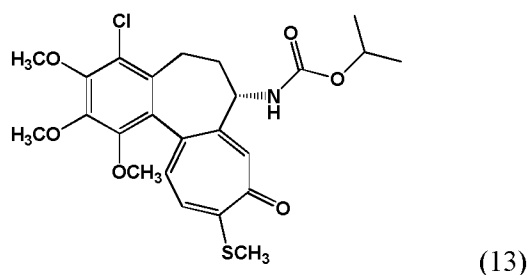
ESI-MS ( $m/z$ ):  $[M+H]^+$  534,  $[M+Na]^+$  556,  $[M+K]^+$  572,  $[2M+Na]^+$  1089.

$^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  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,  $CDCl_3$ )  $\delta$  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  
 380 reakcyjnej dodano izopropanol (0,5 ml).

Otrzymano izopropylu-*N*-karbaminian-*N*-deacetylo-4-chloro-10-demetoksy-10-metylotio-  
 kolchicynę z wydajnością 30%.

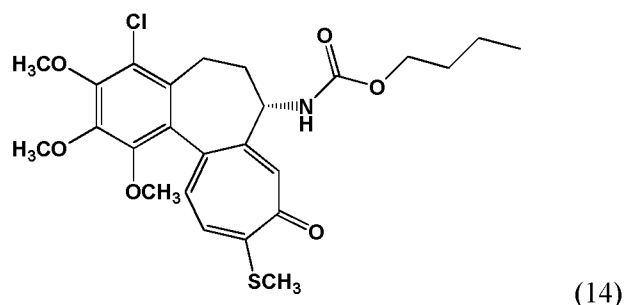
ESI-MS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> 494, [M+Na]<sup>+</sup> 516, [2M+H]<sup>+</sup> 987.

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 182,4, 159,2, 155,0, 150,2, 149,9, 149,8, 146,7, 136,5, 134,5,  
 385 131,7, 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.

<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,30 (s, 1H), 7,21 (d, *J* = 10,4 Hz, 1H), 7,03 (d, *J* = 10,5 Hz, 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,  
 390 3H), 2,30 – 1,65 (m, 3H), 1,18 (dd, *J* = 8,6, 6,3 Hz, 6H).

#### Przykład 6

Otrzymywanie butylu-*N*-karbaminianu-*N*-deacetylo-4-chloro-10-demetoksy-10-metylotio-  
 kolchicyny o wzorze 14



395 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%.

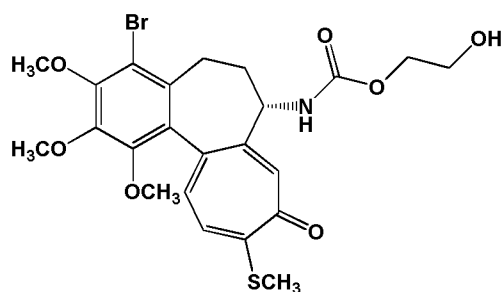
ESI-MS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> 508, [M+Na]<sup>+</sup> 530, [2M+H]<sup>+</sup> 1115, [2M+Na]<sup>+</sup> 1037.

400 <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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.

<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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  
405 (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

410 O t r z y m y w a n i e 2-hydroksyetylo-*N*-karbaminianu-*N*-deacetylo-4-bromo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny o wzorze 15



(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  
415 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  
420 ciśnieniem, pozostałość rozpuszczono w chlorku metylenu i ekstrahowano roztworem HCl<sub>(aq)</sub>

(0,5 M), a następnie wodą. Warstwę organiczną odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono przy użyciu chromatografu CombiFlash® stosując kolumnę wypełnioną SiO<sub>2</sub> oraz mieszaninę heksan:octan etylu przy wzrastającym gradiencie stężeń octanu etylu od 0 do 100%.

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

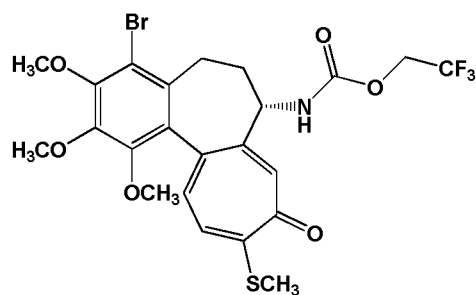
ESI-MS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> 540, [M+Na]<sup>+</sup> 563, [2M+H]<sup>+</sup> 1101.

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 182,4, 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, 61,4, 61,1, 61,0, 53,7, 34,9, 29,0, 15,1.

430 <sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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).

435 Przykład 8

Otrzymywanie 2,2,2-trifluoroetylo-*N*-karbaminianu-*N*-deacetylo-4-bromo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicy 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.

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

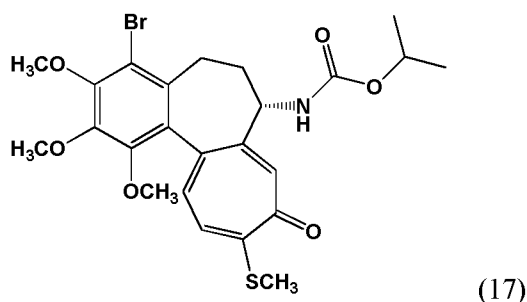
445 ESI-MS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> 578, [M+Na]<sup>+</sup> 600, [2M+H]<sup>+</sup> 1155, [2M+Na]<sup>+</sup> 1177.

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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.

<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,37 (s, 1H), 7,22 (d, *J* = 10,3 Hz, 1H), 7,06 (d, *J* = 10,6 Hz, 1H),  
450 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, 3H), 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

455 Otrzymywanie izopropylu-*N*-karbaminianu-*N*-deacetylo-4-bromo-10-demetoksy-10-metylotio-  
kolchicyny o wzorze 17



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

460 Otrzymano izopropylu-*N*-karbaminian-*N*-deacetylo-4-bromo-10-demetoksy-10-metylotio-  
okolchicyny z wydajnością 32%.

ESI-MS (m/z): [M+Na]<sup>+</sup> 560, [2M+Na]<sup>+</sup> 1097.

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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,  
465 15,1.

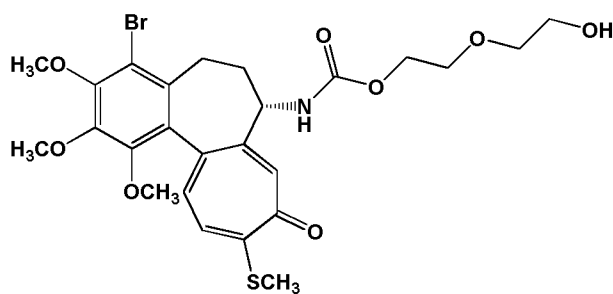
<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,29 (s, 1H), 7,19 (d, *J* = 10,3 Hz, 1H), 7,02 (d, *J* = 10,4 Hz, 1H),  
5,15 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 4,77 (dp, *J* = 12,5, 6,2 Hz, 1H), 4,35 – 4,26 (m, 1H), 3,97 (s,

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).

470

Przykład 10

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



475 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%.

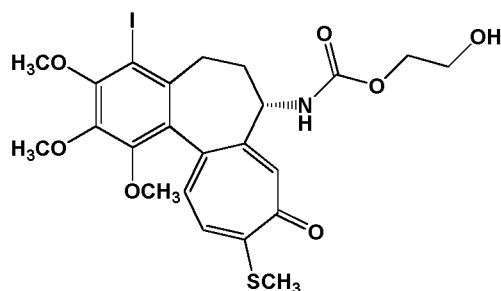
ESI-MS ( $m/z$ ):  $[M+H]^+$  584,  $[M+Na]^+$  606,  $[2M+Na]^+$  1189.

480  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  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,  $CDCl_3$ )  $\delta$  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).

490 Przykład 11

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



(19)

Do roztworu *N*-deacetylo-4-jodo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny (100 mg, 0,20 mmol)  
495 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  
500 pomocą chromatografii TLC. Następnie odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym  
ciśnieniem, pozostałość rozpuszczono w chlorku metylenu i ekstrahowano roztworem HCl<sub>(aq)</sub>  
(0,5 M), a następnie wodą. Warstwę organiczną odparowano do sucha pod zmniejszonym  
ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono przy użyciu chromatografu CombiFlash® stosując  
kolumnę wypełnioną SiO<sub>2</sub> oraz mieszaninę heksan:octan etylu przy wzrastającym gradiencie  
505 stężeń octanu etylu od 0 do 100%.

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

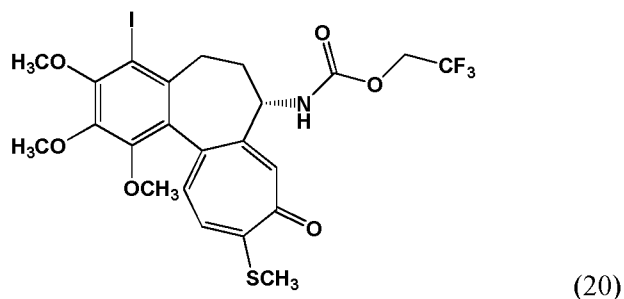
ESI-MS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> 588, [M+Na]<sup>+</sup> 610, [2M+H]<sup>+</sup> 1175, [2M+Na]<sup>+</sup> 1197.

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 182,4, 159,2, 155,9, 153,5, 151,4, 150,4, 145,5, 137,3, 136,8,  
510 134,6, 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.

<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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).

515    Przykład 12

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



520    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-trifluoroetylo-*N*-karbaminian-*N*-deacetylo-4-jodo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny z wydajnością 27%.

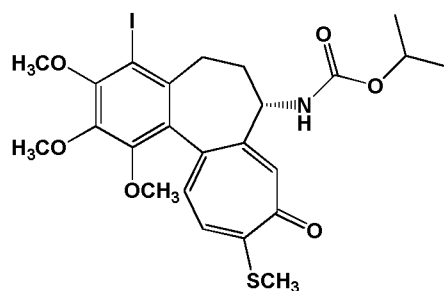
525    ESI-MS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> 626, [M+Na]<sup>+</sup> 648.

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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.

530    <sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,36 (d, *J* = 6,3 Hz, 1H), 7,21 (t, *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

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



(21)

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

Otrzymano izopropylu-*N*-karbaminian-*N*-deacetylo-4-jodo-10-demetoksy-10-metylotio-  
 kolchicyny z wydajnością 33%.

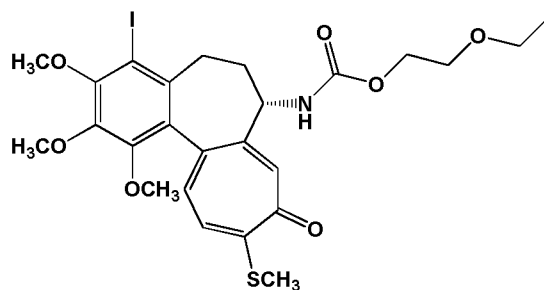
ESI-MS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> 586, [M+Na]<sup>+</sup> 608.

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 182,4, 159,2, 155,0, 153,4, 151,4, 149,9, 145,6, 136,9, 136,7,  
 545 134,3, 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.

<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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  
 550 (dd, *J* = 9,1, 6,3 Hz, 6H).

#### Przykład 14

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



(22)

555 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-metylotio-  
kolchicyny z wydajnością 29%.

ESI-MS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> 616, [M+Na]<sup>+</sup> 638.

560 <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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.

<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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,  
565 3H), 3,95 (s, 3H), 3,60 (d, *J* = 2,8 Hz, 3H), 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).