

## 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 polega na  
10           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 wysoką toksyczność i niską  
15           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 płuc)  
20           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.

25 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 płuc) oraz porównywalną cytotoksycznością

30 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 współczynniki selektywności tych związków.

35 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 dla tego typu pochodnych.

40 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). Spośród czterech opisanych pochodnych z grupą amidową w pozycji C-7 oraz grupą metylosulfidową w pozycji C-10 dwie pochodne

45 charakteryzowały się cytotoksycznością w stosunku do linii komórkowej P388 na poziomie niemodyfikowanej kolchicyny, a pozostałe dwie pochodne wykazywały gorszą cytotoksyczność od związku wyjściowego. Informacje zawarte w tej publikacji dotyczą wyłącznie badań *in vivo* wobec myszy z wszczepionymi mysimi komórkami nowotworowych. Organizm myszy istotnie różni się od organizmu człowieka, zatem nie można wyników uzyskanych dla komórek mysich

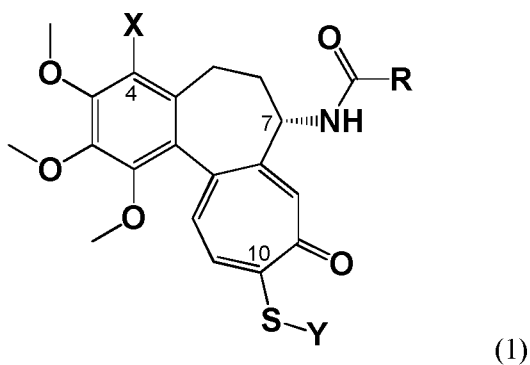
50 bezpośrednio odnosić do komórek ludzkich, zatem nie można wnioskować o cytotoksyczności

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  
55 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  
60 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 amidowe pochodne *N*-deacetylo-4-(bromo/chloro/jodo)-10-  
65 demetoksy-10-alkilotiokolchicyny o wzorze ogólnym 1



gdzie:

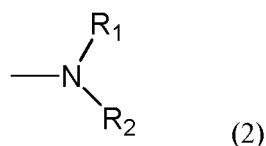
- X oznacza Cl, Br lub I;
- Y oznacza grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 4 atomów węgla;
- R oznacza:
  - grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 10 atomów węgla,

70

- 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,

75

- grupę alkilową prostą zawierającą od 2 do 6 atomów węgla zawierającą w dowolnej pozycji łańcucha wiązania eterowe,
- fenyl,
- grupę aminową o wzorze ogólnym 2

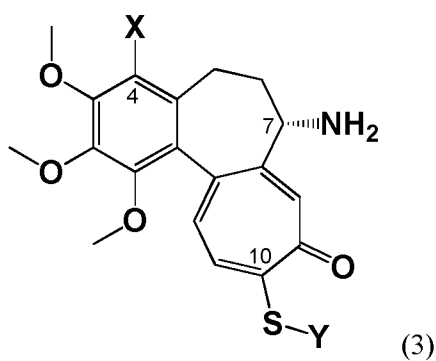


80

gdzie podstawniki  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$  są różne lub takie same i oznaczają atom wodoru lub grupę alkilową prostą zawierającą od 1 do 4 atomów węgla.

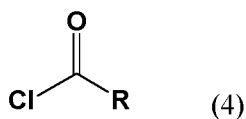
W drugim aspekcie przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania nowych amidów *N*-deacetylo-4-(bromo/chloro/jodo)-10-demetoksy-10-alkilotiokolchicyny o wzorze ogólnym 1, w którym X, R i Y mają wyżej podane znaczenie w reakcji pomiędzy związkiem o wzorze ogólnym 3,

85



w którym X i Y mają wyżej podane znaczenie w reakcji z chlorkiem kwasowym o wzorze ogólnym 4,

90

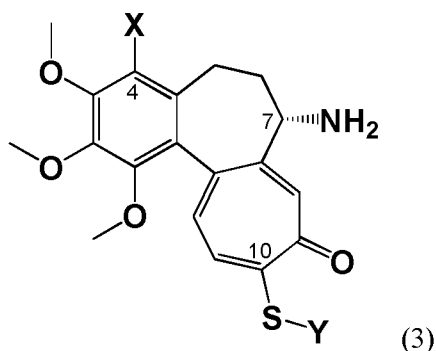


w którym R ma wyżej podane znaczenie w obecności zasady organicznej pełniącej rolę nukleofilowego katalizatora oraz aminy alifatycznej.

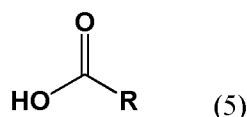
Reakcję prowadzi się w rozpuszczalniku apolarnym chloroalifatycznym, aromatycznym lub  
95 w tetrahydrofuranie, korzystnie w chloroformie, chlorku metylenu, toluenie, benzenie,  
tetrahydrofuranie. Korzystne jest prowadzenie reakcji w warunkach bezwodnych. Jako  
nukleofilowy katalizator reakcji stosuje się zasadę organiczną, korzystnie pirydynę, 4-  
pirolidynopirydynę (PPY), 4-dimetylaminopirydynę (DMAP), najkorzystniej 4-  
dimetylaminopirydynę (DMAP). Jako aminę alifatyczną stosuje się korzystnie tributylloaminę,  
100 tripropyloaminę, triizobutyloaminę, triiizopropyloaminę, diizopropyloaminę, *N,N*-  
diizopropyloetyloaminę, trietyloaminę, najkorzystniej trietyloaminę. Aminy kompleksują  
powstający w wyniku rozpadu chlorku kwasowego produkt uboczny – chlorowodór. Wiązanie  
chlorowodoru przez aminę zapobiega zachodzeniu niepożądanych reakcji i zapobiega rozpadowi  
związku o wzorze 3. Do mieszaniny związku o wzorze 3 i aminy alifatycznej rozpuszczonych w  
105 rozpuszczalniku apolarnym dodaje się nukleofilowy katalizator, a następnie odpowiedni chlorek  
kwasowy o wzorze ogólnym 4. Reakcję prowadzi się w temperaturze nie wyższej niż 25 °C,  
korzystnie stopień przereagowania kontroluje się za pomocą chromatografii TLC. Następnie  
odsąca się wytrącony osad chlorowodoru aminy alifatycznej. Jeżeli reakcja była prowadzona w  
innym rozpuszczalniku niż rozpuszczalnik chloroalifatyczny, rozpuszczalnik odparowuje się pod  
110 zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszcza w rozpuszczalniku chloroalifatycznym,  
korzystnie w chlorku metylenu lub chloroformie i ekstrahuje roztworem  $\text{HCl}_{(\text{aq})}$  (0,5 M), a  
następnie wodą. Jeżeli reakcja była prowadzona w rozpuszczalniku chloroalifatycznym pomija się  
etap odparowywania rozpuszczalnika i od razu przechodzi się do ekstrakcji. Następnie warstwę  
organiczną odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszcza się przy użyciu  
115 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 przedmiotem jest sposób otrzymywania  
120 nowych amidów *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 3.



125 w którym X i Y mają wyżej podane znaczenia a odpowiednim kwasem karboksylowym o wzorze ogólnym 5,



gdzie R ma wyżej podane znaczenie w obecności czynnika sprzęgającego oraz zasady organicznej. Czynniki sprzęgające jest aktywatorem grupy karboksylowej. W wyniku reakcji związku o wzorze ogólnym 5 z czynnikiem sprzęgającym wytworzony zostaje aktywny ester, który następnie reaguje z grupą aminową związku o wzorze ogólnym 3 prowadząc do wytworzenia związku o wzorze ogólnym 1.

130

Reakcję prowadzi się w rozpuszczalniku apolarnym chloroalifatycznym, aromatycznym lub w tetrahydrofuranie, korzystnie w chloroformie, chlorku metylenu, toluenie, benzenie, tetrahydrofuranie, najkorzystniej w chloroformie lub chlorku metylenu lub w rozpuszczalniku polarnym aprotycznym - prostym nitylu, korzystnie acetonitrylu lub prostym trzeciorzędowym amidzie, korzystnie dimetyloformamidzie. Korzystne jest prowadzenie reakcji w warunkach bezwodnych. Jako czynnik sprzęgając stosuje się heksafluorofosforan 2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametylomocznika (HATU) (*ang.* 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate) lub N,N'-dicykloheksylokarbodiimid (DCC), przy czym w przypadku stosowania DCC korzystne jest stosowanie dodatkowo kwasu p-

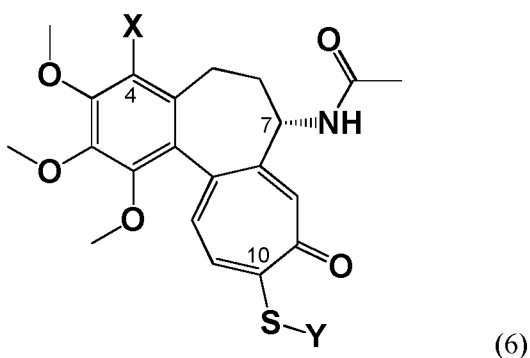
135

140

toluenosulfonowego lub *N*-hydroksysukcynoimidu lub 3-hydroksy-4-keto-1,2,3-benzotriazyny lub *N*-hydroksybenzotriazolu (HOBt).

Jako zasadę organiczną stosuje się pirydynę lub jej pochodne, korzystnie pirydynę, 4-  
145 pirolidynopirydynę (PPY), 4-dimetylaminopirydynę (DMAP), najkorzystniej 4-pirolidynopirydynę (PPY).

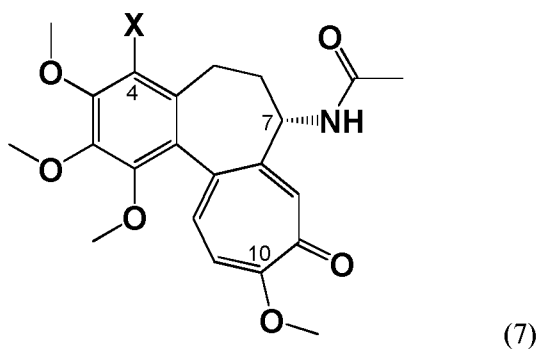
Związek pośredni o wzorze ogólnym 3 można otrzymać ze związku o wzorze ogólnym 6



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

Reakcję deacetylacji związku o wzorze 6 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  
155 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 6 można otrzymać w reakcji pomiędzy związkiem o wzorze ogólnym 7



160

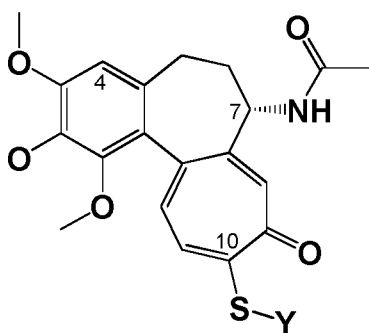
w reakcji z alkilotiolanem o wzorze ogólnym 8



w którym Y ma wyżej podane znaczenie.

165 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 6 można również otrzymać w reakcji pomiędzy związkiem o wzorze ogólnym 9



170

(9)

a:

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

lub

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

175

lub

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

180 Reakcję prowadzi się w rozpuszczalniku protycznym tj. prostym kwasie karboksylowym, korzystnie kwasie mrówkowym lub kwasie octowym lub w rozpuszczalniku polarnym aprotycznym tj. prostym nitrilu, korzystnie acetonitrilu. 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 dokсорubicynę,
- LoVo/DX - ludzki gruczolak jelita grubego oporny na dokсорubicynę.

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 dokсорubicynę	ATCC CCL-229
LoVo/DX	ludzki gruczolak jelita grubego oporny na dokсорubicynę	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	<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> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <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 LoVo/DX	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 BALB/3T3	<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 fiole. 10 ml (Teva Pharmaceuticals Sp. z o.o., Warszawa, Polska)
Doksorubicyna	Koncentrat do sporządzania roztworu do infuzji; 2 mg/ml; 1 fiole. 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 205 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.*,  
210 *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-dolkowe w trzech powtórzeniach. Doświadczenia powtarzano minimum trzy razy.

a) Komórki (pochodzące z hodowli *in vitro*) nanoszono do dołek płytki w liczbie  $1 \times 10^4$  w  
215 przypadku linii LoVo, LoVo/DX, MCF-7 oraz BALB/3T3 lub  $0,5 \times 10^4$  dla linii A549 komórek w 100  $\mu$ l 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 dołek dodawano rozcieńczenia badanych związków w badanych stężeniach w objętości 100  $\mu$ l medium hodowlanego do rozcieńczeń, a do dołek przeznaczonych na kontrolę wzrostu komórek nietraktowanych oraz dołek przeznaczonych na kontrolę medium bez komórek dodano 100  $\mu$ l samego medium hodowlanego,  
220 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>).

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

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.

230

#### Odczyt SRB:

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  
235 każdego dołka dodano po 50  $\mu$ l 0,1 % roztworu sulforodaminy B (SRB) w 1% kwasie octowym w

240 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  $\mu$ 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, Winooski VT, USA.

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

$$245 \quad \% \text{ zahamowania proliferacji} = \left( \left( \frac{A_t - A_m}{A_k - A_m} \right) \times 100 \right) - 100$$

gdzie,

$A_m$  – średnia wartość absorbancji medium kontrolnego

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

250  $A_t$  – 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  $\leq$  10%. Z danych % zahamowania proliferacji wyznaczano parametr  $IC_{50}$  według metody opisanej w D. Nevozhay *et al.*, *Plos One* 2014, 9:10. Następnie, z kolejnych 3-5 powtórzeń testu, wyliczono 255 średnią wartość  $IC_{50}$  i odchylenie standardowe.

260 Dla wszystkich badanych pochodnych wyznaczono wskaźnik  $IC_{50}$ , 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  $\mu$ M 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.  
 265 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.

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]		IC <sub>50</sub> [μM]	SI	IC <sub>50</sub> [μM]	SI	
Kolchicyna	0,125	1,1	0,054	2,6	0,108	1,3	1,69	0,1	15,7	0,139	
12	0,013	1,0	0,013	0,9	0,008	1,6	0,068	0,2	8,9	0,013	
13	0,029	2,7	0,018	4,3	0,010	8,0	0,166	0,5	17,0	0,079	
14	0,011	1,3	0,012	1,2	0,007	2,0	0,036	0,4	4,8	0,014	
15	0,010	1,1	0,011	1,0	0,007	1,5	0,087	0,1	12,1	0,011	
16	0,010	2,0	0,011	1,8	0,007	2,9	0,076	0,3	10,8	0,020	
17	0,833	0,4	0,846	0,4	0,568	0,5	3,866	0,1	6,8	0,305	
18	0,081	1,3	0,095	1,1	0,065	1,7	0,794	0,1	12,3	0,107	
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	

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

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

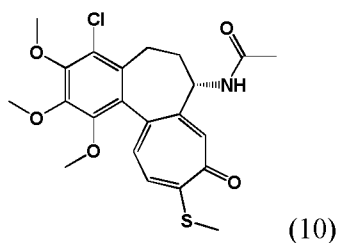
Indeks SI (*Selectivity Index*) = IC<sub>50</sub> dla normalnej linii komórkowej (BALB/3T3) / IC<sub>50</sub> dla poszczególnych linii komórek nowotworowych.

275

Wynalazek ilustrują przykłady

Przykład 1

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



280

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  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . 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%.

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

## 290 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  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . 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%.

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

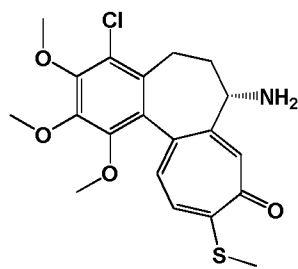
ESI-MS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  450,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  472,  $[\text{2M}+\text{H}]^+$  889,  $[\text{2M}+\text{Na}]^+$  921.

300  $^{13}\text{C}$  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.

$^1\text{H}$  NMR (403 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  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), 305 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 11



(11)

310 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<sub>3</sub> w celu zobojętnienia. Całość ekstrahowano czterokrotnie CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Połączone warstwy organiczne wysuszono nad MgSO<sub>4</sub>, przesączono i odparowano pod zmniejszonym

315 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 50 do 100%.

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.

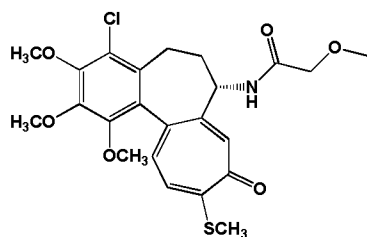
320 <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 182,4, 158,7, 153,1, 150,1, 149,2, 146,2, 137,0, 134,0, 132,6, 129,8, 129,2, 125,5, 121,8, 61,3, 61,1, 53,5, 38,3, 26,5, 15,1.

<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, 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).

325

### Przykład 3

Otrzymywanie metoksyacetamidu-*N*-deacetylo-4-chloro-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny o wzorze 12.



(12)

330



355 Otrzymano (4-chloro)butanoamid *N*-deacetylo-4-chloro-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny z wydajnością 40 %.

ESI-MS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> 512, [M+Na]<sup>+</sup> 534, [M+K]<sup>+</sup> 550, [2M+H]<sup>+</sup> 1025, [2M+Na]<sup>+</sup> 1047, [2M+K]<sup>+</sup> 1063.

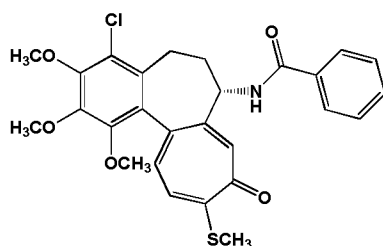
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 182,3, 171,7, 159,2, 151,1, 150,2, 149,8, 146,7, 137,3, 134,8, 131,8,  
360 129,9, 128,5, 126,4, 122,2, 61,7, 61,5, 61,1, 51,8, 44,4, 35,0, 33,0, 28,1, 26,0, 15,2.

<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.74 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.30 – 7.25 (m, 1H), 7.09 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 4.63 (dt, *J* = 11.8, 6.9 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.98 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 3.54 (dd, *J* = 9.8, 3.6 Hz, 2H), 3.24 (dd, *J* = 13.3, 4.6 Hz, 1H), 2.54 – 2.40 (m, 5H), 2.29 – 2.12 (m, 2H), 2.11 – 2.01 (m, 2H), 1.87 (ddd, *J* = 16.7, 9.0, 3.3 Hz, 1H).

365

#### Przykład 5

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



(14)

370 Postępowano jak w przykładzie 3 przy czym zamiast chlorku metoksyacetylu do mieszaniny reakcyjnej dodano chlorek benzoilu (88 μl, 0,75 mmol).

Otrzymano benzamid *N*-deacetylo-4-chloro-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny z wydajnością 78 %.

ESI-MS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> 512, [M+Na]<sup>+</sup> 534, [2M+H]<sup>+</sup> 1023, [2M+Na]<sup>+</sup> 1045.

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 182,2, 167,0, 159,2, 150,8, 150,2, 149,8, 146,7, 137,2, 134,7, 133,3,  
375 131,8, 131,6, 130,1, 128,6, 128,4, 127,1, 126,2, 122,2, 61,8, 61,5, 61,1, 52,4, 34,8, 26,0, 15,2.

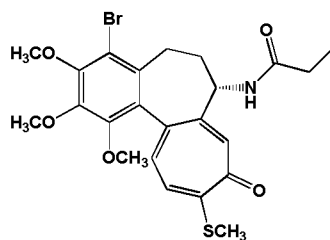
<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,84 – 7,76 (m, 3H), 7,50 (s, 1H), 7,40 – 7,4 (m, 1H), 7,31 – 7,27 (m, 3H), 7,08 (d, *J* = 10,8 Hz, 1H), 4,83 (dt, *J* = 11,9, 6,7 Hz, 1H), 4,01 (s, 3H), 3,98 (s,

380 3H), 3,72 (s, 3H), 3,33 – 3,24 (m, 1H), 2,44 (s, 3H), 2,38 – 2,17 (m, 2H), 2,05 (ddd,  $J =$   
10,8, 9,5, 4,3 Hz, 1H).

#### Przykład 6

Otrzymywanie propanoamidu *N*-deacetylo-4-bromo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny o

385 wzorze 15



Do roztworu *N*-deacetylo-4-bromo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny (100 mg, 0,22 mmol) w tetrahydrofuranie (10 ml) w temperaturze pokojowej dodano trietyloaminę (1 ml) oraz DMAP (41 mg, 0,33 mmol) i mieszano przez 20 minut, a następnie dodano chlorek propionylu (58  $\mu$ l, 66  
390 mmol) i dalej mieszano w temperaturze pokojowej do czasu zakończenia reakcji, kontrolowanej za pomocą chromatografii TLC. Następnie odsączono wytrącony chlorowodorek trietyloaminy, przesącz odparowano 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  
395 chromatografu CombiFlash® stosując kolumnę wypełnioną  $\text{SiO}_2$  oraz mieszaninę heksan:octan etylu przy wzrastającym gradiencie stężeń octanu etylu od 0 do 100 %.

Otrzymano propanoamid *N*-deacetylo-4-bromo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny z wydajnością 87 %.

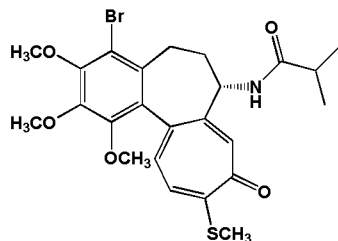
ESI-MS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  508,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  530,  $[\text{2M}+\text{Na}]^+$  1037.

400  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  182,3, 173,8, 159,1, 151,2, 151,1, 150,4, 146,6, 137,4, 134,7, 133,5,  
130,2, 128,3, 126,2, 113,5, 61,6, 61,5, 61,0, 51,8, 34,7, 29,2, 29,0, 15,1, 9,6.

$^1\text{H}$  NMR (403 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,58 (d,  $J = 7,2$  Hz, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,26 – 7,22 (m, 1H), 7,09 – 7,04 (m, 1H), 4,64 – 4,52 (m, 1H), 3,97 (s, 3H), 3,95 (s, 3H), 3,63 (s, 3H), 3,27 – 3,22 (m, 1H), 2,44 (s, 3H), 2,34 – 2,20 (m, 4H), 1,89 – 1,77 (m, 1H), 1,10 (dd,  $J = 8,9, 6,3$  Hz, 3H).

## Przykład 7

Otrzymywanie 2-metylopropanoamidu *N*-deacetylo-4-bromo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny o wzorze 16



(16)

410 Postępowano jak w przykładzie 6 przy czym zamiast chlorku propionylu do mieszaniny reakcyjnej dodano chlorek izobutyrylu (70  $\mu$ l, 66 mmol).

Otrzymano 2-metylopropanoamid *N*-deacetylo-4-bromo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny z wydajnością 64 %.

ESI-MS (m/z):  $[M+H]^+$  522,  $[M+Na]^+$  544,  $[2M+Na]^+$  1065.

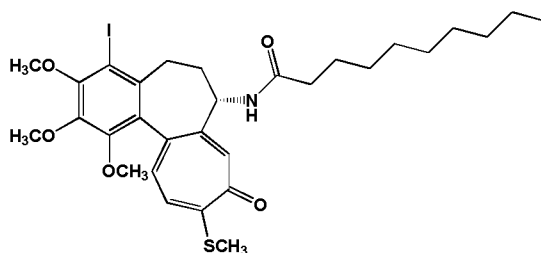
415  $^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  182,3, 177,0, 159,1, 151,1, 150,9, 150,5, 146,6, 137,3, 134,6, 133,5, 130,2, 128,4, 126,1, 113,5, 61,7, 61,5, 61,0, 51,4, 35,2, 34,9, 29,1, 19,5, 19,5, 15,2.

$^1H$  NMR (403 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7,41 (s, 1H), 7,26 – 7,21 (m, 2H), 7,06 (d,  $J = 10,6$  Hz, 1H), 4,64 – 4,54 (m, 1H), 3,98 (s, 3H), 3,97 (s, 3H), 3,65 (s, 3H), 3,24 (dd,  $J = 8,2, 3,2$  Hz, 1H), 2,53 (dt,  $J = 13,8, 6,9$  Hz, 1H), 2,45 (s, 3H), 2,24 (dt,  $J = 7,4, 4,0$  Hz, 2H), 1,87 – 1,76 (m, 1H), 1,16

420 (dd,  $J = 6,9, 1,1$  Hz, 6H).

## Przykład 8

Otrzymywanie dekanoamidu *N*-deacetylo-4-jodo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny o wzorze 17



(17)

425 Do roztworu *N*-deacetylo-4-jodo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny (100 mg, 0,20 mmol) w tetrahydrofuranie (10 ml) w temperaturze pokojowej dodano trietyloaminę (1 ml) oraz DMAP (37

mg, 30 mmol) i mieszano przez 20 minut, a następnie dodano chlorek dekanoilu (125  $\mu$ l, 0,60 mmol) i dalej mieszano w temperaturze pokojowej do czasu zakończenia reakcji, kontrolowanej za pomocą chromatografii TLC. Następnie odsączono wytrącony chlorowodorek trietyloaminy, 430 przesącz odparowano 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  $\text{SiO}_2$  oraz mieszaninę heksan:octan etylu przy wzrastającym gradiencie stężeń octanu etylu od 0 do 100%.

435 Otrzymano dekanoamid *N*-deacetylo-4-jodo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny z wydajnością 90 %.

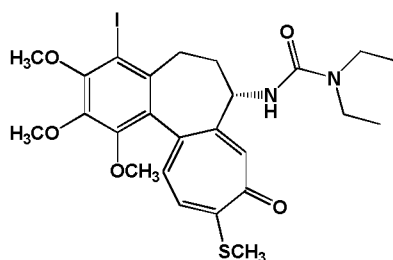
ESI-MS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  654,  $[\text{2M}+\text{H}]^+$  1307.

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$   $^{13}\text{C}$  182,3, 173,2, 159,1, 153,4, 151,4, 151,0, 145,6, 137,7, 136,8, 134,5, 129,7, 128,4, 126,1, 92,2, 61,6, 61,3, 60,7, 51,6, 36,3, 34,7, 34,5, 31,8, 29,3, 29,3, 440 29,3, 29,2, 25,5, 22,6, 15,1, 14,1.

$^1\text{H}$  NMR (403 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,46 (d,  $J = 6,9$  Hz, 1H), 7,41 (s, 1H), 7,23 (d,  $J = 10,3$  Hz, 1H), 7,07 (d,  $J = 10,6$  Hz, 1H), 4,58 (dt,  $J = 11,8, 6,9$  Hz, 1H), 3,97 (s, 3H), 3,95 (s, 3H), 3,64 (s, 3H), 3,16 (dd,  $J = 13,9, 5,0$  Hz, 1H), 2,45 (s, 3H), 2,39 (dd,  $J = 13,7, 6,3$  Hz, 1H), 2,31 – 2,17 (m, 3H), 1,77 (td,  $J = 12,0, 5,4$  Hz, 1H), 1,60 (dt,  $J = 15,3, 7,7$  Hz, 2H), 1,32 – 1,20 (m, 445 12H), 0,86 (t,  $J = 6,9$  Hz, 3H).

#### Przykład 9

Otrzymywanie 1,1-dietylomocznika *N*-deacetylo-4-jodo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny o wzorze 18



450

(18)

Postępowano jak w przykładzie 8 przy czym zamiast chlorku dekanoilu do mieszaniny reakcyjnej dodano chlorek dietylokarbamoilowy (76  $\mu$ l, 0,60 mmol).

Otrzymano 1,1-dietylomocznik *N*-deacetylo-4-jodo-10-demetoksy-10-metylotiokolchicyny z wydajnością 45 %.

455 ESI-MS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> 599, [M+Na]<sup>+</sup> 621, [2M+H]<sup>+</sup> 1197, [2M+Na]<sup>+</sup> 1219.

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  182,2, 158,8, 156,0, 153,2, 152,1, 151,4, 145,5, 137,6, 137,0, 134,3, 129,9, 128,9, 125,9, 92,1, 61,7, 61,3, 60,7, 52,9, 41,0, 35,2, 34,8, 15,1, 13,9.

<sup>1</sup>H NMR (403 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7,42 (s, 1H), 7,14 (dd, *J* = 8,9, 3,8 Hz, 1H), 6,98 – 6,94 (m, 1H), 5,84 – 5,78 (m, 1H), 4,48 (dt, *J* = 11,7, 6,7 Hz, 1H), 3,89 (s, 3H), 3,87 (s, 3H), 3,58 (s, 3H), 3,24 (q, *J* = 7,1 Hz, 4H), 3,06 (dd, *J* = 13,8, 4,7 Hz, 1H), 2,36 (s, 3H), 2,31 (dd, *J* = 13,6, 6,2 Hz, 1H), 2,22 – 2,11 (m, 1H), 1,76 (td, *J* = 12,0, 5,3 Hz, 1H), 1,07 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H).

460