

Nowe pochodne kolchicyny i ich zastosowanie.

DZIEDZINA WYNAŁAZKU

Przedmiotem wynalazku są pochodne kolchicyny oraz ich zastosowanie do wytwarzania preparatów o działaniu przeciwnowotworowym.

10 TŁO WYNAŁAZKU

Z roku na rok liczba zachorowań na nowotwory złośliwe systematycznie wzrasta, a brak pełnej skuteczności obecnie stosowanych chemioterapeutyków oraz szereg efektów ubocznych, które wywołują, prowadzi do śmierci wielu pacjentów. W związku z tym wielu laboratoriach badawczych trwają nieustanne prace nad poszukiwaniem nowych związków, które będą miały dobre właściwości antynowotworowe i jednocześnie wysoki indeks terapeutyczny. Jednym z najbardziej racjonalnych i efektywnych sposobów poszukiwania nowych środków leczniczych jest chemiczna modyfikacja różnorodnych związków pochodzenia naturalnego posiadających udowodnioną aktywność biologiczną.

20 Kolchicyna jest alkaloidem izolowanym głównie z nasion zimowita jesiennego (Colchicum autumnale) i gloriozy wspaniałej (Gloriosa superba). Charakteryzuje się ona wysoką cytotoksycznością in vitro i in vivo oraz wykazuje działanie przeciwzapalne, przeciwmiotyczne, przeciwzłótnieniowe i immunomodulujące. Aktywność biologiczna kolchicyny jest wynikiem zdolności wiązania się z tubuliną, która przyczynia się do zatrzymania polimeryzacji mikrotubul oraz tworzenia wrzeciona kariokinetycznego. Z tego powodu cykl komórkowy zostaje zahamowany, co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórki, i chociaż kolchicyna wykazuje silne działanie antyproliferacyjne jej zastosowanie w terapii jest ograniczone ze względu na jej toksyczność i lekooporność.

30 W publikacji naukowej [V. Blasco et. al., Eur. J. Med. Chem. **2018**, 150, 817-828] ujawniono pochodne kolchicyny z ugrupowaniem mocznikowym przy węglu C-7. Wszystkie wprowadzone podstawniki (za wyjątkiem cykloheksylowego) miały charakter

aromatyczny i były niepodstawione lub podstawione różnego rodzaju grupami, zarówno elektronoakceptorowymi jak i elektronodonorowymi. Testy hamowania proliferacji komórkowej przeprowadzono *in vitro* na trzech liniach komórek nowotworowych: okrężnicy HT-29, piersi MCF-7, szyjki macicy HeLa i na jednej nienowotworowej - komórkach embrionalnych nerki HEK-293. Większość przedstawionych analogów wykazywała wysoką aktywność, a część z nich miała także dobre współczynniki selektywności. Informacje zawarte w publikacji ograniczają się jednak tylko do badań *in vitro*, zatem nieznane jest działanie tych związków „w żywym organizmie” (*in vivo*). Niewiadomą jest również zdolność otrzymanych pochodnych do przełamania lekooporności komórek nowotworowych.

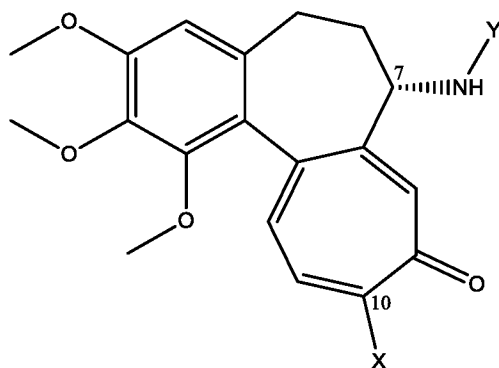
Z kolei w publikacji [H. Nishiyama et. al., *Med. Chem. Commun.* **2014**, 5, 452-458] autorzy ujawnili podwójnie modyfikowane analogi kolchicyny mające w pozycji C-4 atom chloru, a w pozycji C-7 różne podstawniki, m.in. szkielet mocznikowy czy tiomocznikowy. Część z zaprojektowanych związków wykazała lepszą aktywność niż niemodyfikowana chemicznie kolchicyna wobec komórek nowotworów płuc A549 oraz jelita grubego HT-29 i HCT116. Najbardziej cytotoksyczne związki zostały następnie zbadane pod kątem ich aktywności *in vivo* na myszach z przeszczepionym ludzkim rakiem okrężnicy HCT116. Wyniki pokazały, że odpowiednio zaprojektowane pochodne mocznikowe i tiomocznikowe posiadają dobre właściwości przeciwnowotworowe i nie wykazują oznak toksyczności u myszy, jednakże uzyskanych rezultatów nie można bezpośrednio odnieść do komórek człowieka, gdyż organizm myszy istotnie różni się od ludzkiego.

W publikacji [M. Cifuentes et. al., *Bioor. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 2761-2764] przedstawione zostały 7-tioacetamidowe analogi kolchicyny i izokolchicyny. Aktywność biologiczna *in vitro* tych pochodnych została określona w testach hamowania polimeryzacji tubuliny oraz wzrostu komórek ludzkiego raka prostaty PC3. Związki wykazały porównywalne, gorsze lub lepsze aktywności od związku wyjściowego. Nie zbadano jednak toksyczności względem komórek zdrowych, nieznane są zatem współczynniki selektywności opisanych substancji.

Do chwili obecnej pochodne kolchicyny nie znalazły szerokiego zastosowania w chemioterapii. Niemniej jednak, zdolność kolchicyny do hamowania namnażania się komórek nowotworowych sprawia, że wciąż poszukuje się jej pochodnych wykazujących porównywalną lub lepszą od niej aktywność przeciwnowotworową.

Istotą wynalazku są nowe pochodne kolchicyny otrzymane w wyniku jej chemicznej modyfikacji, które wykazują aktywność antyproliferacyjną wobec komórek nowotworowych i mogą znaleźć zastosowanie w terapii różnych rodzajów nowotworów.

Zgodnie z tym, jednym z aspektów tego wynalazku są nowe związki o wzorze (I):

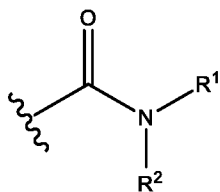


(I)

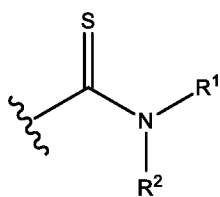
1

70 w którym:

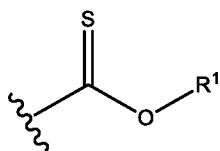
- X oznacza grupę metyloaminową -NHCH₃;
- Y oznacza grupę:



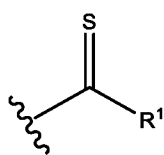
lub



lub



lub



80

R^1 i R^2 każdy jednocześnie lub niezależnie oznacza:

- atom wodoru,
- grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 10 atomów węgla,
- grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 2 do 10 atomów węgla posiadającą w dowolnej pozycji łańcucha wiązanie nienasycone,
- grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 10 atomów węgla podstawioną w dowolnej pozycji łańcucha jednym lub więcej atomami halogenu (chlor, brom, jod, fluor), które mogą się znajdować zarówno przy tym samym jak i przy różnych atomach węgla,
- grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną zawierającą od 1 do 10 atomów węgla podstawioną w dowolnej pozycji łańcucha jedną lub więcej grupami hydroksylowymi w postaci wolnej lub zabezpieczonych grupami ochronnymi,
- grupę alkilową zawierającą od 1 do 10 atomów węgla podstawioną w dowolnej pozycji łańcucha, jedną lub większą ilością, identycznych lub różnych grup, wybranych spośród: alkoksylowej, aminowej, cyjanowej, estrowej, karboksylowej, sulfidowej,
- grupę karbocykliczną lub heterocykliczną, przy czym pierścień może być ewentualnie podstawiony, jedną lub większą ilością, identycznych lub różnych grup, wybranych spośród: grupy alkilowej, alkiloaminowej, alkoksylowej, aminowej, cyjanowej, dialkiloaminowej, estrowej, halogenowej (chlor, brom, jod, fluor), hydroksylowej, karboksylowej, sulfidowej, trifluorometylowej,
- grupę alkilową podstawioną w dowolnej pozycji łańcucha grupą karbocykliczną lub heterocykliczną, przy czym pierścień może być ewentualnie podstawiony, jedną lub większą ilością, identycznych lub różnych grup, wybranych spośród: grupy alkilowej, alkiloaminowej, alkoksylowej, aminowej, cyjanowej, dialkiloaminowej, estrowej, halogenowej (chlor, brom, jod, fluor), hydroksylowej, karboksylowej, sulfidowej, trifluorometylowej,

90

100

110

Jeszcze innym aspektem wynalazku jest zastosowanie pochodnych kolchicyny do wytwarzania preparatów o działaniu przeciwnowotworowym. Nowe pochodne kolchicyny o wzorze ogólnym (I) są użyte do wytwarzania preparatów leczniczych przydatnych w chemioterapii ludzkiego raka płuc, gruczolaka piersi, gruczolaka jelita grubego, w tym wrażliwego na doksorubicynę jak i opornego na doksorubicynę.

120 SZCZEGÓŁOWY OPIS WYNAŁAZKU

Poszczególne aspekty niniejszego wynalazku staną się jasne po zapoznaniu z zamieszczonym poniżej szczegółowym opisem wykonania wynalazku wraz z przykładami stanowiącymi jego ilustracje.

Definicje

Stosowane w niniejszym opisie i zastrzeżeniach patentowych terminy, jeśli występują, mają następujące znaczenia.

„Grupa alkilowa” odnosi się do prostolącuchowego lub rozgałęzionego węglowodoru zawierającego do 10 atomów węgla, jak np. etyl ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2-propyl (izopropyl, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2-metylo-3-pentyl ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) itp.

130 „Grupa alkoksylowa” odnosi się do rodnika o wzorze $-\text{OR}_a$, w którym R_a oznacza grupę alkilową jak zdefiniowano powyżej, jak np. metoksy ($-\text{OCH}_3$), etoksy ($-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 2-propoksy (izopropoksy, $-\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$) itp.

„Grupa karbocykliczna” oznacza nasycony, nienasycony lub aromatyczny monocykl lub policykl, który jest albo podstawiony albo niepodstawiony, jak np. cyklobutyl, fenyl, 1-cyklopent-1-enyl itp.

140 „Grupa heterocykliczna” oznacza grupę karbocykliczną określoną powyżej, gdzie jeden lub więcej atomów węgla zostało zastąpionych przez atom tlenu, azotu lub siarki, w którym atomy te mogą być ewentualnie utlenione oraz atom azotu może być ewentualnie czwartorzędowy. Przykłady takich heterocykli obejmują np. piperydynyl, piperazylnyl, pirol, 2-oksopiperazylnyl, tiofen, morfolina itp.

„Grupa alkiloaminowa” odnosi się do rodnika o wzorze $-\text{NHR}_a$, w którym R_a oznacza rodnik alkilowy jak zdefiniowano powyżej, jak np. metyloamino, propyloamino itp.

„Grupa dialkiloaminowa” odnosi się do rodnika o wzorze $-\text{NR}_a\text{R}_a$, w którym każdy z symboli R_a oznacza odpowiednio rodnik alkilowy jak zdefiniowano powyżej, jak np. dimetyloamino, etylopropyloamino itp.

„Ewentualny” lub „ewentualnie” oznacza, że opisane dalej zdarzenie lub okoliczności mogą lecz nie muszą wystąpić, a opis obejmuje przypadki, w których to zdarzenie lub okoliczność występuje bądź nie.

150 Termin „terapia” lub „leczenie” stosuje się do stosowania leku zawierającego nowe związku według wynalazku o wzorze (I), do leczenia choroby lub stanu chorobowego i obejmuje zapobieganie chorobie lub stanowi hamowanie choroby lub stanu, eliminowanie choroby lub stanu i/lub łagodzenie jednego lub większej liczby objawów choroby lub stanu.

Farmaceutycznie akceptowalne substancje pomocnicze są znane i przedstawione przykładowo w Remington: The Science and Practice of Pharmacy 1995, edycja E. W. Martin, Mack Publishing Company, wydanie 19, Easton, Pa.

160 W dokumencie przedstawiono przykłady ilustrujące wynalazek oraz opisano różne sposoby ich otrzymywania. Przykłady te nie powinny być interpretowane jako ograniczające zakres zastrzeżanego wynalazku. Związki według wynalazku można wytwarzać przez zastosowanie znanych reakcji i procedur chemicznych. Metody ilustrują naturę tych sposobów i w zamierzeniu nie ograniczają zakresu możliwych do wykorzystania metod.

Specjaliści w dziedzinie syntezy organicznej zauważają, że materiały wyjściowe, warunki czy kolejność przekształceń mogą być różne, a reakcje należy prowadzić w rozpuszczalniku odpowiednim dla używanych reagentów czy dla planowanych transformacji. Dostępnych jest wiele odnośników ogólnych podających powszechnie znane schematy syntez chemicznych i warunki przydatne do syntetyzowania ujawnionych związków, przykładowo: Smith i March, March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure, wydanie piąte, Wiley-Interscience, 2001 lub Vogel, A Textbook of Practical Organic Chemistry, Including Qualitative Organic Analysis, wydanie czwarte, 170 New York: 5 Longman, 1978. Jest zrozumiałe, a w niektórych przypadkach może być konieczne zastosowanie ochrony reaktywnych grup funkcyjnych niezbędne dla uzyskania odpowiedniego przekształcenia. Potrzeba takich grup ochronnych oraz warunki ich dołączenia i usunięcia będą oczywiste dla specjalistów w tej dziedzinie. Zestawienia opisujące wiele alternatyw zawarte są przykładowo w: J. F. W. McOmie, Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, London i New York 1973 czy T. W. Greene i P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, wydanie trzecie, Wiley, New York 1999.

Materiały wyjściowe oraz rozpuszczalniki uzyskano ze źródeł komercyjnych (TriMen Chemicals, Sigma Aldrich) lub wytworzono dobrze znanymi sposobami literaturowymi.

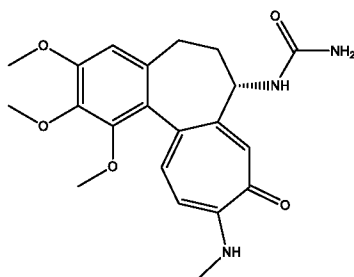
180 Analizy TLC przeprowadzono przy użyciu płytek aluminiowych (grubość 0,2 mm, F-254). Kolumny chromatograficzne wykonywano stosując żel krzemionkowy o wysokiej czystości (rozmiar porów 60 Å, rozmiar cząstek 40-63 µm, 230-400 mesh).

Widma ¹H i ¹³C NMR zostały wykonane w rozpuszczalnikach deutrowanych (CDCl₃, CD₂Cl₂, CD₃CN, itp.) na spektrometrze Bruker Avance DRX 500.

Analizy ESI-MS wykonano przy użyciu modułu separacyjnego Waters Alliance 2695 z detektorem UV PDA 2996 i detektorem mas Waters Micromass ZQ 2000 wyposażonym w kolumnę Kinetex Biphenyl 50×2,1 mm, 2,6 μm, przy przepływie 0,3 ml/min gradientu 3-100% (przez 6 min) acetonitrylu w wodzie.

190 W przykładach opisano szczegółowo nowe pochodne kolchicyny według wynalazku poprzez sposób ich wytwarzania.

Przykład 1.



N-deacetylo-10-demetoksy-10-metyloaminokolchicynę (1,0 equiv.) rozpuszczono w THF, dodano trietyloaminę (5,0 equiv.) i schłodzono kolbę w łaźni lód/woda. Następnie wkroplono 20% roztwór fosgenu w toluenie (1,6 equiv.) i mieszano dodatkowo przez 1 godzinę. Po tym czasie przez mieszaninę przepuszczono gazowy amoniak (nadmiar) i kontynuowano reakcję w temperaturze pokojowej. Postęp monitorowano za pomocą TLC lub LC-MS. Mieszaninę rozcieńczono AcOEt, przemyto 5% NaHCO₃, solanką i suszono nad Na₂SO₄. Produkt oczyszczono na żelu krzemionkowym stosując układ AcOEt/MeOH uzyskując czysty związek z wydajnością 15%.

Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

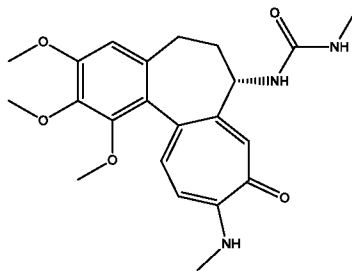
ESI-MS dla C₂₁H₂₅N₃O₅ (m/z): [M+H]⁺ 400, [M+Na]⁺ 422, [2M+H]⁺ 799, [2M+Na]⁺ 821, [M-H]⁻ 398, [M+HCOO]⁻ 444.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.75 (s, 1H), 7.51 – 7.46 (m, 2H), 7.323 – 7.31 (m, 1H), 6.62 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 4.84 (s, 2H), 4.64 – 4.51 (m, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.10 (d, J = 5.4 Hz, 3H), 2.50 – 2.39 (m, 1H), 2.35 – 2.30 (m, 2H), 1.82 – 1.77 (m, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 175.2, 158.4, 155.4, 153.0, 151.1, 141.5, 139.7, 134.8, 130.7, 126.8, 123.1, 108.7, 107.2, 61.5, 61.4, 56.2, 53.1, 37.7, 30.2, 29.5.

210

Przykład 2.



N-deacetylo-10-demetoksy-10-metyloaminokolchicynę (1,0 equiv.) rozpuszczono w DCM, dodano trietyloaminę (2,0 equiv.) i N-metylokarbaminian N-sukcynimidyłowy (1,0 equiv.). Postęp reakcji monitorowano za pomocą TLC lub LC-MS. Mieszaninę poreakcyjną rozcieńczono AcOEt, przemyto 5% NaHCO₃, solanką i suszono nad Na₂SO₄. Produkt oczyszczono na żelu krzemionkowym stosując układ AcOEt/MeOH uzyskując czysty związek z wydajnością 99%.

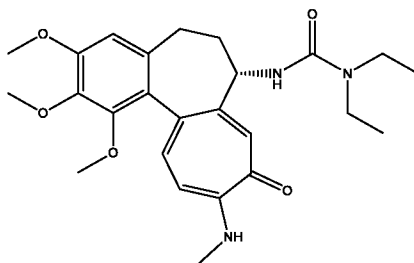
220 Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

ESI-MS dla C₂₂H₂₇N₃O₅ (m/z): [M+H]⁺ 414, [M+Na]⁺ 436, [2M+H]⁺ 827, [2M+Na]⁺ 849, [M-H]⁻ 412, [M+HCOO]⁻ 458.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.46 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.69 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 7.45 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 12.2 Hz, 1H), 6.52 (s, 1H), 4.57 – 4.51 (m, 1H), 3.89 – 3.82 (m, 6H), 3.65 (s, 3H), 3.10 (d, J = 4.4 Hz, 3H), 2.61 (s, 3H), 2.43 – 2.39 (m, 1H), 2.38 – 2.29 (m, 1H), 2.16 – 1.98 (m, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 164.2, 159.1, 155.7, 155.2, 153.9, 150.5, 144.1, 141.1, 135.9, 135.5, 125.0, 121.8, 115.1, 107.4, 61.5, 61.3, 56.1, 53.4, 38.5, 30.2, 30.2, 26.6.

Przykład 3.



230

N-deacetylo-10-demetoksy-10-metyloaminokolchicynę (1,0 equiv.) rozpuszczono w DCM, dodano trietyloaminę (2,0 equiv), chlorek dietylokarbamoilowy (1,0 equiv.) i ogrzewano w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną. Postęp reakcji monitorowano za pomocą TLC lub LC-MS. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono AcOEt, przemyto 5% NaHCO₃, solanką i suszono nad Na₂SO₄. Związek oczyszczono na kolumnie chromatograficznej

wypełnionej żelom krzemionkowym w układzie AcOEt/MeOH uzyskując produkt z wydajnością 94%.

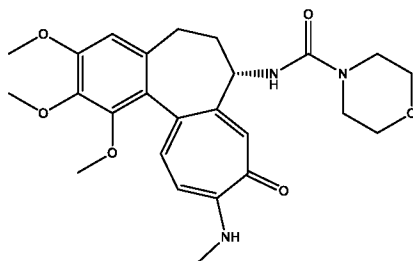
Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

ESI-MS dla $C_{25}H_{33}N_3O_5$ (m/z): $[M+H]^+$ 456, $[M+Na]^+$ 478, $[2M+H]^+$ 911, $[2M+Na]^+$ 933,
240 $[M+HCOO]^-$ 500.

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.24 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.67 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 6.82 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.01 (s, 1H), 4.69 – 4.61 (m, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.52 – 3.42 (m, 2H), 3.28 (dq, J = 14.3, 7.1 Hz, 2H), 3.06 (d, J = 3.3 Hz, 3H), 2.49 – 2.41 (m, 1H), 2.36 – 2.28 (m, 2H), 2.21 – 2.16 (m, 1H), 1.09 (t, J = 7.0 Hz, 6H).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 165.6, 156.7, 155.2, 155.1, 153.8, 150.7, 143.3, 141.2, 135.5, 135.2, 125.4, 122.8, 113.9, 107.4, 61.6, 61.3, 56.2, 54.1, 41.3, 38.5, 30.4, 30.1, 14.0.

Przykład 4.



Związek otrzymano według procedury opisanej w przykładzie 3, stosując takie same ilości reagentów, sposób wyodrębniania i oczyszczania, przy czym zamiast chlorku dietylokarbamidowego do mieszaniny reakcyjnej dodano chlorek morfolino-4-karbonylowy (2,0 equiv.). Czysty produkt uzyskano z wydajnością 88%.

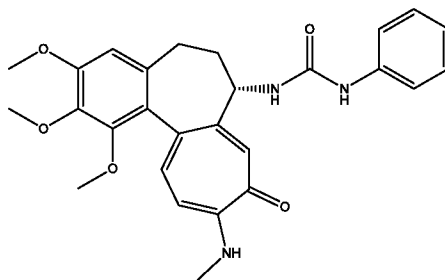
Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

ESI-MS dla $C_{25}H_{31}N_3O_6$ (m/z): $[M+H]^+$ 470, $[M+Na]^+$ 492, $[2M+H]^+$ 939, $[2M+Na]^+$ 961, $[M-H]^-$ 468, $[M+HCOO]^-$ 514.

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.56 (s, 1H), 7.43 (d, J = 11.1 Hz, 1H), 7.20 (q, J = 4.9 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 6.54 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 6.48 (s, 1H), 4.70 – 4.58 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.61 (s, 3H), 3.60 – 3.55 (m, 4H), 3.47 – 3.39 (m, 4H), 3.05 (d, J = 5.4 Hz, 3H), 2.41 – 2.35 (m, 1H), 2.33 – 2.15 (m, 2H), 1.95 – 1.83 (m, 1H).

260 ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 174.7, 157.2, 155.2, 152.8, 152.6, 151.0, 141.5, 139.3, 134.8, 130.4, 126.9, 123.2, 108.2, 107.2, 66.6, 61.4, 61.4, 56.1, 53.9, 44.2, 37.4, 30.4, 29.5.

Przykład 5.



N-deacetylo-10-demetoksy-10-metyloaminokolchicynę (1,0 equiv.) rozpuszczono w THF i wkropiono rozcieńczony THF izocyjanian fenylu (1,5 equiv.). Postęp reakcji monitorowano za pomocą TLC lub LC-MS. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono AcOEt, przemyto 5% NaHCO₃, solanką i suszono nad Na₂SO₄. Związek oczyszczono na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żelem krzemionkowym w układzie DCM/MeOH uzyskując produkt z wydajnością 99%.

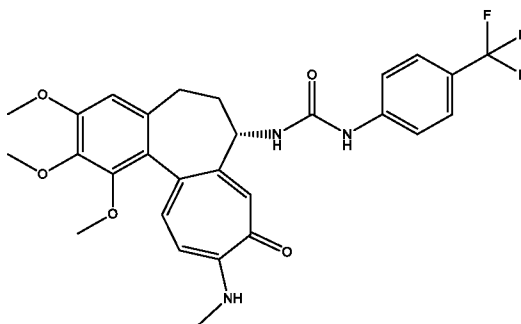
Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

ESI-MS dla C₂₇H₂₉N₃O₅ (m/z): [M+H]⁺ 476, [M+Na]⁺ 498, [2M+H]⁺ 951, [M-H]⁻ 474, [M+HCOO]⁻ 520.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.30 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.55 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 7.40 – 7.28 (m, 2H), 7.20 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.04 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 6.81 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 6.66 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 4.76 – 4.58 (m, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.09 (d, J = 5.4 Hz, 3H), 2.44 – 2.36 (m, 1H), 2.35 – 2.23 (m, 2H), 1.70 – 1.64 (m, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 174.8, 155.5, 155.3, 153.2, 153.0, 151.1, 141.5, 140.1, 139.4, 134.7, 131.0, 128.7, 126.7, 123.2, 122.1, 119.3, 109.2, 107.2, 61.6, 61.5, 56.2, 52.7, 38.22, 30.2, 29.6.

Przykład 6.



Związek otrzymano według procedury opisanej w przykładzie 5, stosując takie same ilości reagentów, sposób wyodrębniania i oczyszczania, przy czym zamiast izocyjanianiu fenylu

do mieszaniny reakcyjnej dodano izocyjanian 4-trifluorometylofenylu (1,5 equiv.). Czysty produkt uzyskano z wydajnością 88%.

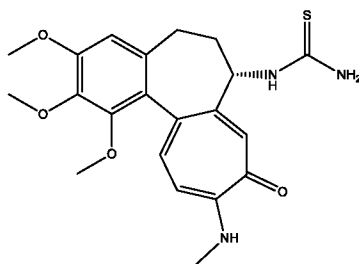
Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

ESI-MS dla $C_{28}H_{28}F_3N_3O_5$ (m/z): $[M+H]^+$ 544, $[2M+H]^+$ 1086, $[M-H]^-$ 542, $[M+HCOO]^-$ 588.

290 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 9.01 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.72 (d, J = 11.8 Hz, 1H), 7.66 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.26 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.86 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 6.55 (s, 1H), 4.79 – 4.59 (m, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.07 (d, J = 4.3 Hz, 3H), 2.44 – 2.36 (m, 2H), 2.26 – 2.12 (m, 1H), 2.06 – 2.01 (m, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 165.7, 155.3, 155.0, 154.4, 154.0, 150.7, 143.9, 143.0, 141.4, 135.7, 135.1, 125.7, 125.7, 125.5, 125.2, 123.3, 122.1, 118.2, 114.6, 107.5, 61.5, 61.4, 56.2, 53.1, 38.6, 30.1, 30.0.

Przykład 7.



300 Związek otrzymano według procedury opisanej w przykładzie 1, stosując takie same ilości reagentów, sposób wyodrębniania i oczyszczania, przy czym zamiast roztworu fosgeny w toluenie do mieszaniny reakcyjnej dodano tiofosgen rozcieńczony THF (1,6 equiv.). Czysty produkt uzyskano z wydajnością 91%.

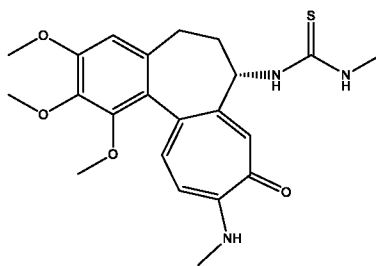
Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

ESI-MS dla $C_{21}H_{25}N_3O_4S$ (m/z): $[M+H]^+$ 416, $[M+Na]^+$ 438, $[2M+H]^+$ 831, $[M-H]^-$ 414, $[M+HCOO]^-$ 460.

1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.49 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 7.22 (s, 1H), 6.77 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 6.72 (s, 1H), 4.96 – 4.92 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.08 (s, 3H), 2.58 – 2.54 (m, 1H), 2.33 – 2.29 (m, 2H), 1.96 – 1.92 (m, 1H).

310 ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 185.0, 176.0, 157.1, 154.4, 152.8, 152.1, 142.6, 141.2, 136.3, 131.5, 128.0, 123.5, 110.1, 108.6, 62.4, 61.7, 58.6, 56.6, 38.9, 30.8, 29.6.

Przykład 8.



320 N-deacetylo-10-demetoksy-10-metyloaminokolchicynę (1,0 equiv.) rozpuszczono w DCM, schłodzono w łaźni lód/woda i wkroplono tiofosgen rozcieńczony DCM (1,5 equiv.). Po 1,5 godziny do mieszaniny dodano chlorowodorek metyloaminy (2,0 equiv.), usunięto łaźnię chłodzącą i kontynuowano reakcję w temperaturze pokojowej kontrolując jej postęp za pomocą TLC lub LC-MS. Następnie mieszaninę rozcieńczono AcOEt, przemyto 5% NaHCO₃, solanką i suszono nad Na₂SO₄. Związek oczyszczono na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żelem krzemionkowym w układzie AcOEt/MeOH uzyskując produkt z wydajnością 70%.

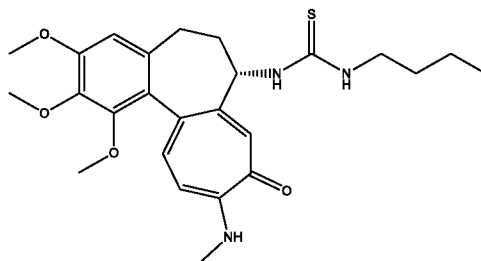
Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

ESI-MS dla C₂₂H₂₇N₃O₄S (m/z): [M+H]⁺ 430, [M+Na]⁺ 452, [2M+H]⁺ 859, [2M+Na]⁺ 881, [M-H]⁻ 428, [M+HCOO]⁻ 474.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.84 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.57 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.68 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.11 (s, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.11 (d, J = 5.1 Hz, 3H), 2.96 (s, 3H), 2.45 – 2.29 (m, 3H), 1.89 (s, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 174.2, 155.4, 153.0, 151.3 141.7, 140.3, 134.7, 131.5, 126.7, 123.0, 109.5, 107.2, 62.3, 61.5, 57.1, 56.2, 37.8, 31.3, 30.2, 29.6.

330 Przykład 9.



Związek otrzymano według procedury opisanej w przykładzie 5, stosując takie same ilości reagentów, sposób wyodrębniania i oczyszczania, przy czym zamiast izocyjanianu fenylu do mieszaniny reakcyjnej dodano izotiocyjanian butylu (1,5 equiv.). Czysty produkt uzyskano z wydajnością 53%.

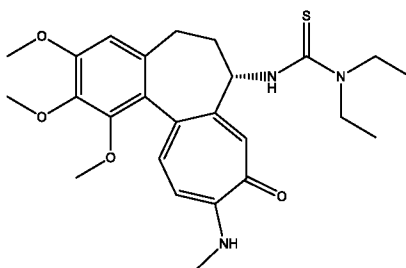
Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

ESI-MS dla $C_{25}H_{33}N_3O_4S$ (m/z): $[M+H]^+$ 472, $[M+Na]^+$ 494, $[2M+H]^+$ 943, $[2M+Na]^+$ 965, $[M-H]^-$ 470, $[M+HCOO]^-$ 516.

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.63 (s, 1H), 7.77 – 7.59 (m, 2H), 7.48 – 7.41 (m, 1H), 6.75 – 6.72 (m, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.16 (s, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.54 (s, 1H), 3.30 (s, 1H), 3.13 (d, J = 5.1 Hz, 3H), 2.49 – 2.24 (m, 3H), 2.04 – 1.90 (m, 1H), 1.51 – 1.36 (m, 2H), 1.24 – 1.19 (m, 2H), 0.78 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 155.4, 153.6, 153.2, 151.2, 141.7, 140.8, 134.8, 132.2, 126.5, 123.1, 110.3, 107.3, 62.4, 61.4, 57.0, 56.2, 44.3, 37.9, 31.3, 30.2, 29.7, 20.08, 13.8.

Przykład 10.



Związek otrzymano według procedury opisanej w przykładzie 8, stosując takie same ilości reagentów, sposób wyodrębniania i oczyszczania, przy czym zamiast chlorowodoru metyloaminy do mieszaniny reakcyjnej dodano dietyloaminę (2,0 equiv.). Czysty produkt uzyskano z wydajnością 69%.

Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

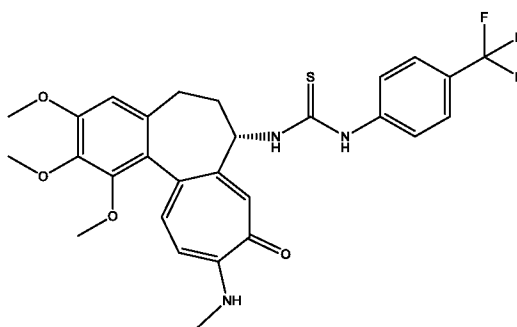
ESI-MS dla $C_{25}H_{33}N_3O_4S$ (m/z): $[M+H]^+$ 472, $[M+Na]^+$ 494, $[2M+H]^+$ 943, $[2M+Na]^+$ 965, $[M-H]^-$ 470, $[M+HCOO]^-$ 516.

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.50 – 7.42 (m, 3H), 7.14 – 7.12 (m, 1H), 6.58 – 6.46 (m, 2H), 5.40 – 5.36 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.80 – 3.73 (m, 5H), 3.67 – 3.60 (m, 2H), 3.05 (d, J = 5.2 Hz, 3H), 2.44 – 2.38 (m, 1H), 2.33 – 2.25 (m, 2H), 2.16 – 2.12 (m, 1H), 1.18 (t, J = 6.9 Hz, 6H).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 179.7, 174.6, 155.1, 152.8, 152.2, 151.3, 141.6, 139.1, 134.7, 130.7, 127.0, 123.9, 108.1, 107.2, 62.3, 61.4, 58.9, 56.1, 45.7, 37.6, 30.5, 29.6, 13.0.

360

Przykład 11.



Związek otrzymano według procedury opisanej w przykładzie 5, stosując takie same ilości reagentów, sposób wyodrębniania i oczyszczania, przy czym zamiast izocyjanianu fenylu do mieszaniny reakcyjnej dodano izotiocyjanian 4-trifluorometylofenylu (1,5 equiv.). Czysty produkt uzyskano z wydajnością 99%.

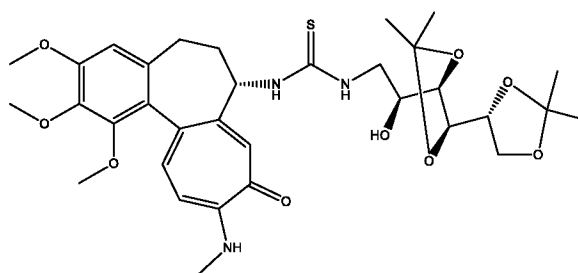
Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

ESI-MS dla $C_{28}H_{28}F_3N_3O_4S$ (m/z): $[M+H]^+$ 560, $[2M+H]^+$ 1119, $[2M+Na]^+$ 821, $[M-H]^-$ 558.

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 9.54 (s, 1H), 9.39 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.62 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.36 – 7.30 (m, 1H), 7.14 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.72 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 6.56 (s, 1H), 5.15 – 5.08 (m, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.08 (d, J = 5.4 Hz, 3H), 2.56 – 2.35 (m, 3H), 2.10 – 1.97 (m, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 181.4, 173.9, 155.5, 153.2, 152.2, 151.3, 141.8, 141.7, 140.9, 134.5, 131.6, 126.6, 125.7, 125.2, 125.2, 123.9, 123.0, 122.7, 110.0, 107.3, 62.2, 61.4, 57.2, 56.2, 37.5, 30.0, 29.5.

Przykład 12.



Związek otrzymano według procedury opisanej w przykładzie 8, stosując takie same ilości reagentów, sposób wyodrębniania i oczyszczania, przy czym zamiast chlorowodoru metyloaminy do mieszaniny reakcyjnej dodano 3,4;5,6-di-O-isopropylidene-1-amino-1-deoksy-D-glucitol (2,0 equiv.). Czysty produkt uzyskano z wydajnością 76%.

Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

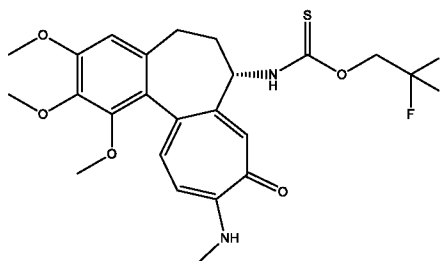
ESI-MS dla $C_{33}H_{45}N_3O_9S$ (m/z): $[M+H]^+$ 660, $[M+Na]^+$ 682, $[M-H]^-$ 658, $[M+HCOO]^-$ 704.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 9.12 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.53 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 7.35 – 7.31 (m, 2H), 6.63 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.13 – 5.10 (m, 1H), 4.10 – 3.90 (m, 6H), 3.91 – 3.82 (m, 6H), 3.79 (s, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.41 – 3.36 (m, 1H), 3.07 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H), 2.50 – 2.31 (m, 3H), 1.99 (s, 1H), 1.33 (s, 3H), 1.29 – 1.26 (m, 9H).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 183.2, 174.7, 155.4, 152.9, 152.5, 151.3, 141.6, 140.0, 134.7, 131.1, 126.8, 123.4, 109.7, 109.6, 109.2, 107.1, 81.2, 77.2, 69.4, 67.6, 62.2, 61.5, 57.1, 56.1, 48.8, 37.9, 30.2, 29.5, 27.1, 26.9, 26.6, 25.4.

390

Przykład 13.



Związek otrzymano według procedury opisanej w przykładzie 8, stosując takie same ilości reagentów, sposób wyodrębniania i oczyszczania, przy czym zamiast chlorowodoru metyloaminy do mieszaniny reakcyjnej dodano trifluoroetanolan sodu (nadmiar). Czysty produkt uzyskano z wydajnością 61%.

Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

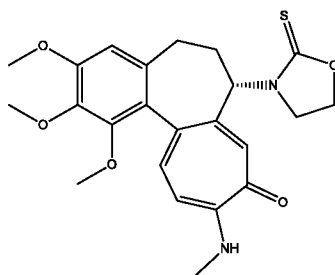
ESI-MS dla $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 500, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 521, $[2\text{M}+\text{H}]^+$ 997, $[\text{M}-\text{H}]^-$ 497.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 10.15 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.55 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 7.41 – 7.34 (m, 1H), 6.66 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.05 – 4.84 (m, 2H), 4.23 – 4.16 (m, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.65 (s, 3H), 3.10 (d, $J = 5.4$ Hz, 3H), 2.57 – 2.51 (m, 1H), 2.47 – 2.40 (m, 2H), 2.34 – 2.29 (m, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 188.5, 174.7, 155.8, 153.0, 151.2, 150.1, 141.6, 140.0, 134.5, 130.7, 126.7, 124.0, 123.3, 109.0, 107.3, 65.0, 61.7, 61.4, 59.0, 56.1, 37.5, 30.1, 29.5.

400

Przykład 14.



410 Związek otrzymano według procedury opisanej w przykładzie 8, stosując takie same ilości reagentów, sposób wyodrębniania i oczyszczania, przy czym zamiast chlorowodoru metyloaminy do mieszaniny reakcyjnej dodano fluoroetanolan sodu. Czysty produkt uzyskano z wydajnością 18%.

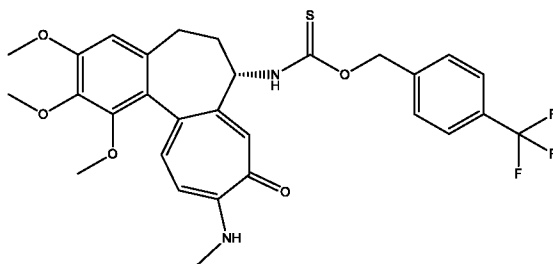
Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

ESI-MS dla $C_{23}H_{26}N_2O_5S$ (m/z): $[M+H]^+$ 443, $[2M+H]^+$ 885, $[M-H]^-$ 441, $[M+HCOO]^-$ 487.

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.48 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 7.30 – 7.26 (m, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.63 – 6.46 (m, 2H), 5.07 (dd, J = 12.4, 6.4 Hz, 1H), 4.75 (q, J = 9.6 Hz, 1H), 4.64 (td, J = 9.5, 5.4 Hz, 1H), 4.32 (td, J = 9.6, 5.4 Hz, 1H), 3.98 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.08 (d, J = 5.4 Hz, 3H), 2.60 – 2.54 (m, 1H), 2.51 – 2.43 (m, 1H), 2.37 – 2.29 (m, 1H), 2.24 – 2.11 (m, 1H).

420 ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 188.3, 175.2, 155.3, 153.0, 151.3, 147.8, 141.9, 139.5, 133.6, 129.4, 126.8, 122.6, 107.8, 107.1, 62.1, 61.4, 59.9, 56.1, 47.5, 35.8, 29.8, 29.5.

Przykład 15.



Związek otrzymano według procedury opisanej w przykładzie 8, stosując takie same ilości reagentów, sposób wyodrębniania i oczyszczania, przy czym zamiast chlorowodoru metyloaminy do mieszaniny reakcyjnej dodano fenolan 4-trifluorobenzylowy sodu. Czysty produkt uzyskano z wydajnością 19%.

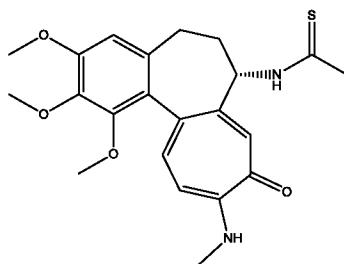
Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

430 ESI-MS dla $C_{29}H_{29}F_3N_2O_5S$ (m/z): $[M+H]^+$ 575, $[2M+H]^+$ 1149, $[M-H]^-$ 573.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 9.92 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.59 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.17 (d, $J = 8.2$ Hz, 3H), 6.60 – 6.56 (m, 2H), 5.43 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H), 5.17 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H), 5.05 – 5.00 (m, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 2.96 (d, $J = 5.4$ Hz, 3H), 2.58 – 2.50 (m, 1H), 2.47 – 2.39 (m, 2H), 2.32 – 2.28 (m, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 190.1, 174.9, 155.4, 153.1, 151.1, 150.8, 141.7, 140.0, 139.9, 134.5, 130.8, 128.7, 126.8, 125.3, 125.0, 125.0, 123.4, 108.5, 107.3, 71.1, 61.9, 61.4, 58.6, 56.1, 37.6, 30.2, 29.3.

Przykład 16.



440 N-deacetylo-10-demetoksy-10-metyloaminokolchicynę (1,0 equiv.) rozpuszczono w PhCH_3 , dodano odczynnik Lawesson'a (1,1 equiv.) i ogrzewano mieszaninę pod chłodnicą zwrotną w układzie wypełnionym argonem. Postęp reakcji monitorowano za pomocą LC-MS. Następnie mieszaninę rozcieńczono AcOEt, przemyto H_2O , 5% NaHCO_3 , solanką i suszono nad Na_2SO_4 . Związek oczyszczono na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żelazem krzemionkowym w układzie AcOEt/MeOH uzyskując produkt z wydajnością 12%.

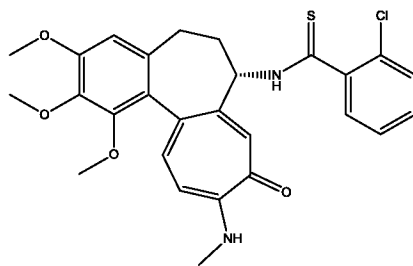
Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

ESI-MS dla $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 415, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 437, $[\text{2M}+\text{H}]^+$ 829, $[\text{M}-\text{H}]^-$ 413.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 10.95 (s, 1H), 7.57 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.336 – 7.30 (m, 1H), 6.66 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.15 – 5.10 (m, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.12 (d, $J = 5.4$ Hz, 3H), 2.53 – 2.47 (m, 4H), 2.46 – 2.30 (m, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 202.0, 155.3, 153.1, 151.3, 150.6, 141.7, 140.5, 134.5, 131.7, 126.6, 122.3, 109.5, 107.3, 62.4, 61.4, 59.0, 56.2, 36.9, 33.2, 30.06 29.6.

Przykład 17.



460 N-deacetylo-10-demetoksy-10-metyloaminokolchicynę (1,0 equiv.) rozpuszczono w CH_3CN , dodano 5-nitro-1-(2-chlorotiobenzamide)-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-on (1,5 equiv.) i mieszano reagenty w temperaturze pokojowej – postęp reakcji monitorowano za pomocą LC-MS. Następnie mieszaninę rozcieńczono AcOEt, przemyto H_2O , 5% NaHCO_3 , solanką i suszono nad Na_2SO_4 . Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym stosując układ DCM/MeOH uzyskując czysty związek z wydajnością 55%.

Dane spektroskopowe otrzymanego produktu są następujące:

ESI-MS dla $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{S}$ (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 511/513, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 533, $[\text{M}-\text{H}]^-$ 509/511.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 10.52 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.48 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 7.39 (dd, J = 7.7, 1.5 Hz, 1H), 7.22 – 7.16 (m, 1H), 7.06 (dd, J = 7.9, 0.7 Hz, 1H), 6.93 (td, J = 7.8, 1.5 Hz, 1H), 6.84 (td, J = 7.6, 0.8 Hz, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.46 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 5.54 – 5.46 (m, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.04 (d, J = 5.4 Hz, 3H), 2.57 – 2.51 (m, 2H), 2.42 – 2.34 (m, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 197.3, 174.0, 155.3, 153.1, 151.1, 149.9, 141.7, 141.5, 139.8, 134.5, 131.0, 130.5, 129.3, 128.6, 128.0, 127.0, 126.6, 123.5, 108.7, 107.6, 62.1, 61.5, 58.9, 56.1, 37.6, 30.1, 29.4.

Ocenę aktywności cytotoksycznej związków opisanych wzorem **1** przeprowadzono w badaniach in vitro wykorzystując ludzkie linie komórek nowotworowych:

- A549 – ludzki rak płuc,
- MCF-7 – ludzki gruczolak piersi,
- LoVo – ludzki gruczolak jelita grubego wrażliwy na doksorubicynę,
- 480 • LoVo/DX – ludzki gruczolak jelita grubego oporny na doksorubicynę,

Testy potwierdziły działanie cytotoksyczne prezentowanych pochodnych kolchicyny.

Badania wykonano także dla komórek prawidłowych, mysich fibroblastów BALB/3T3, w celu wyznaczenia współczynnika selektywności, który pozwala przewidzieć

czy dany związek w pierwszej kolejności będzie działał na komórki nowotworowe czy na komórki normalne organizmu.

Jako związki referencyjne wykorzystano doksorubicynę i cisplatynę – substancje powszechnie stosowane w chemioterapii nowotworów.

W tabeli 1. zestawiono informacje dotyczące linii komórkowych wykorzystanych w testach cytotoxyczności.

490

Tabela 1.

Symbol linii komórkowej	Nazwa linii komórkowej	Źródło pochodzenia linii komórkowej
A549	ludzki rak płuc	ECACC
MCF-7	ludzki gruczolak piersi	ATCC
LoVo	ludzki gruczolak jelita grubego wrażliwy na doksorubicynę	ATCC
LoVo/DX	ludzki gruczolak jelita grubego oporny na doksorubicynę	ATCC
BALB/3T3	normalne mysie fibroblasty	ATCC

ECACC – European Collection of Authenticated Cell Cultures

ATCC – American Type Culture Collection

Tabela 2. opisuje wykorzystane w badaniach cytotoxyczności media hodowlane, roztwory, rozpuszczalniki, materiały odniesienia.

Tabela 2.

Nazwa	Producent
Medium hodowlane dla linii A-549	<ul style="list-style-type: none"> • OptiMEM+RPMI1640 (1:1) (PChO, IITD) • 5% FBS HyClone (GE Healthcare, USA) • 2 mM L-Glutamina (Sigma Aldrich, Niemcy) • 0,1 mg/ml streptomycyna, 100 U/ml penicylina (Sigma Aldrich, Niemcy i Polfa Tarchomin, Polska)

Medium hodowlane dla linii MCF-7	<ul style="list-style-type: none"> • Eagle medium (PChO, IITD) • 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 (Sigma Aldrich, Niemcy i Polfa Tarchomin, Polska)
Medium hodowlane dla linii LoVo	<ul style="list-style-type: none"> • OptiMEM+RPMI1640 (1:1) (PChO, IITD) • 5% FBS HyClone, (GE Healthcare, USA) • 2 mM L-Glutamina (Sigma Aldrich) • 1 mM pirogronian sodu (Sigma Aldrich) • 0,1 mg/ml streptomycyna, 100 U/ml penicylina (Sigma Aldrich i Polfa Tarchomin)
Medium hodowlane dla linii LoVoDX	Medium dla linii LoVo/DX jak dla LoVo oraz doksorubicyna (Accord) o stężeniu 10 µg/100 ml medium
Medium hodowlane dla linii BALB/3T3	<ul style="list-style-type: none"> • Dulbecco medium (Gibco) • 10% FBS HyClone (GE Healthcare) • 2 mM L-Glutamina (Sigma Aldrich) • 0,1 mg/ml streptomycyna, 100 U/ml penicylina (Sigma Aldrich i Polfa Tarchomin)
Medium testowe do rozcieńczeń	<ul style="list-style-type: none"> • OptiMEM+RPMI1640 (1:1) (PChO, IITD) • 5% FBS HyClone (GE Healthcare) • 2mM L-Glutamina (Sigma Aldrich) • 0,1mg/ml streptomycyna, 100 U/ml penicylina (Sigma Aldrich i Polfa Tarchomin)
10mM TRIS	<ol style="list-style-type: none"> 1. Woda dejonizowana ogólnolaboratoryjna niejałowa 2. TRIZMA BASE (Sigma-Aldrich)
1% kwas octowy	<ol style="list-style-type: none"> 1. Woda dejonizowana ogólnolaboratoryjna niejałowa 2. Kwas octowy 80% CZDA (POCH SA)
0,1% roztwór sulforodaminy B (SRB)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sulforhodamine B sodium salt (Sigma-Aldrich) 2. 1% kwas octowy
50% kwas trójchlorooctowy (TCA)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Woda dejonizowana ogólnolaboratoryjna niejałowa 2. Kwas trichlorooctowy CZDA (POCH SA)
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)

Dokсорubicyna	Koncentrat do sporządzania roztworu do infuzji; 2 mg/ml; 1 fiol. 10 ml (Accord Healthcare Ltd, UK)
---------------	---

500 Badania cytotoksyczności przeprowadzono zgodnie z poniższą procedurą.

Roztwory wyjściowe testowanych związków o stężeniu 10 mg/ml przygotowywano do każdego doświadczenia *ex tempore*, rozpuszczając 1 mg preparatu w odpowiedniej objętości DMSO. Rozpuszczalnikiem dla dalszych rozcieńczeń było medium hodowlane. Związki przetestowano w przedziałach stężeń od 100 do 0,00001 µg/ml. Naważki preparatów do sporządzenia roztworów wyjściowych przygotowywano na wadze analitycznej firmy Mettler Toledo XP26 o dokładności 0,001mg.

Oznaczenie działania cytotoksycznego badanych związków wykonywano w 96-godzinnych hodowlach *in vitro*. Dla oznaczenia aktywności antyproliferacyjnej związków wobec wybranych linii komórkowych zastosowano test kolorymetryczny SRB według
510 P. Skehan et al., J. Natl. Cancer Inst., **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 384-dołkowe w trzech powtórzeniach. Doświadczenia powtarzano minimum trzy razy.

- Komórki (pochodzące z hodowli *in vitro*,) nanoszono do dołków płytki w liczbie 1×10^3 lub $1,5 \times 10^3$ lub 3×10^3 komórek w 50 µl medium hodowlanego, a następnie inkubowano w 37°C, w wilgotnej atmosferze nasyconej 5% CO₂.
- 24 godziny później do dołków dodawano kolejne 100 µl medium (kontrola wzrostu komórek) lub medium zawierającego badane związki w badanych stężeniach.
- 520 • Płytki inkubowano przez kolejne 72 godziny w inkubatorze.
- Po upływie 72 godzin inkubacji komórek ze związkami wykonywano test SRB.
- W każdym doświadczeniu próbki zawierające określone stężenia preparatu nanoszono w trzech powtórzeniach. Doświadczenia powtarzano 3-5 razy.

Odczyt SRB:

Po upływie czasu inkubacji do każdego dołka dodano po 50 µl zimnego 50% kwasu trójchlorooctowego (TCA). Po 60 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej 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
530 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 μ l 10 mM buforu TRIS powodującego rozpuszczenie związanego z białkiem komórek barwnika. Gęstość optyczną poszczególnych próbek odczytywano przy długości fali 540 nm przy użyciu czytnika płytkowego (uniwersalnego) Synergy H4 (BioTek Instruments USA).

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

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

540

gdzie:

A_m – średnia wartość absorbancji medium kontrolnego,

A_k – średnia wartość absorbancji komórek nietraktowanych (kontrola komórek),

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

Przy obliczaniu średniej wartości absorbancji dla danego zestawu dołków, odrzucano wartości odstające na podstawie współczynnika zmienności CV 10%. Z danych % zahamowania proliferacji wyznaczano parametr IC_{50} według metody opisanej w D. Nevozhay et al., PLoS One **2014**, 9, e106186. Następnie, z kolejnych 3-5 powtórzeń

550

testu, wyliczano średnią wartość IC_{50} i odchylenie standardowe.

Dla wszystkich badanych pochodnych wyznaczono wskaźnik IC_{50} , który oznacza stężenie związku niezbędne do zahamowania wzrostu komórek o 50%. Wskaźnik ten wyznaczono także dla związków referencyjnych (cisplatyny i doksorubicyny). Wyniki badań aktywności cytotoksycznej dla wybranych związków przedstawiono w tabeli 3. Otrzymane pochodne wykazują wysoką aktywnością cytotoksyczną, wyższą od powszechnie stosowanych leków przeciwnowotworowych - doksorubicyny i cisplatyny. Dodatkowo, wiele z otrzymanych pochodnych charakteryzuje się dobrymi współczynnikami selektywności (SI). $SI > 1,0$ wskazuje, że związek wykazuje wyższą skuteczność oddziaływania na komórki nowotworowe niż toksyczność w stosunku do komórek

560

zdrowych. Kilka analogów przełamuje także lekooporność; indeks RI < 10 pokazuje, że komórki są wrażliwe na testowany związek.

Tabela 3.

Związek	Linia komórkowa									
	A549		MCF-7		LoVo		LoVo/DX			BALB/ 3T3
	IC ₅₀ [nM]	SI	IC ₅₀ [nM]	SI	IC ₅₀ [nM]	SI	IC ₅₀ [nM]	SI	RI	IC ₅₀ [nM]
1	38,3	3,8	16,2	9,1	10,3	14,3	6254,0	<0,1	609,2	147,0
2	79,2	0,3	11,9	1,8	16,5	1,3	7278,7	<0,1	441,3	21,3
3	108,0	0,8	23,1	3,8	12,0	7,4	1210,3	0,1	100,7	88,5
4	187,4	0,6	124,2	0,9	52,6	2,0	9892,7	<0,1	188,2	106,3
5	12,3	1,6	11,1	1,8	10,3	1,9	1070,3	<0,1	104,3	19,8
6	82,1	0,9	126,0	0,6	19,4	3,7	1045,7	0,1	53,8	72,8
7	11,8	1,3	16,1	0,9	10,8	1,4	1447,7	<0,1	134,7	15,0
8	2,0	4,2	15,9	0,5	9,6	0,9	1029,2	<0,1	106,9	8,2
9	13,0	0,5	16,5	0,4	9,4	0,7	695,4	<0,1	74,0	6,3
10	78,2	1,2	10,3	8,9	15,5	5,9	855,0	0,1	55,3	91,0
11	86,4	0,8	122,5	0,6	53,8	1,2	2740,2	<0,1	50,9	66,9
12	69,5	6,4	14,8	30,0	31,7	14,0	5261,1	0,1	165,8	444,5
13	10,8	1,0	15,6	0,7	8,8	1,2	36,7	0,3	4,2	10,4
14	10,9	1,0	11,3	1,0	10,1	1,1	479,9	<0,1	47,4	11,1
15	87,5	0,9	122,3	0,7	59,9	1,3	440,8	0,2	7,4	79,2
16	12,1	0,9	16,0	0,7	9,5	1,2	90,2	0,1	9,5	11,1
17	6,5	10,1	10,4	6,3	7,7	8,5	75,1	0,9	9,8	65,6
Kolchi- cyna	75,7	1,3	13,3	7,3	9,7	10,2	2441,7	<0,1	252,2	97,0
Doksoru- bicyna	193,2	1,1	235,9	0,9	155,8	1,3	11415,1	<0,1	73,3	203,0
Cispla- tyna	5741,0	1,0	7139,8	0,8	7076,3	0,8	8336,59	0,7	1,2	5665,1

Wartość IC₅₀ – stężenie związku niezbędne do zahamowania wzrostu komórek o 50%.

Indeks SI (Selectivity Index) = (IC₅₀ dla normalnej linii komórkowej (BALB/3T3)) / (IC₅₀ dla poszczególnych linii komórek nowotworowych).

Indeks RI (Resistance Index) = (IC₅₀ LoVo/DX) / (IC₅₀ LoVo).