



MD 4718 B1 2020.10.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4718** (13) **B1**
(51) Int.Cl: C07C 229/46 (2006.01)
C07C 229/50 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului

(21) Nr. depozit: a 2019 0052
(22) Data depozit: 2019.06.21(45) Data publicării hotărârii de
acordare a brevetului:
2020.10.31, BOPI nr. 10/2020

(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE CHIMIE, MD; KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN, BE

(72) Inventatori: KULCIŢKI Veaceslav, MD; GÎRBU Vladilena, MD; PRUTEANU Elena, MD;
RENAUD Philippe, CH; DAELEMANS Dirk, BE; MOLLO Ernesto, IT;
DEFRANOUX Fanny, FR; UNGUR Nikon, MD

(73) Titulari: INSTITUTUL DE CHIMIE, MD; KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN, BE

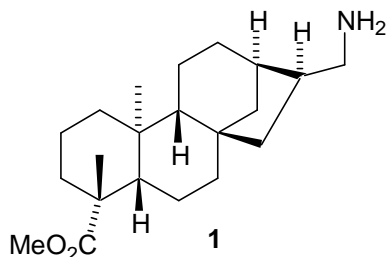
(74) Mandatar autorizat: JOVMIR Tudor

(54) Metil *ent*-17-amino-kauran-19-oat cu activitate citotoxică selectivă

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un derivat al unui compus natural care manifestă proprietăți citotoxice selective față de unele linii de celule canceroase umane și poate fi utilizat în calitate de agent chimioterapeutic în tratarea anumitor maladii oncologice.

Conform invenției, se revendică compusul metil *ent*-17-amino-kauran-19-oat cu formula 1:



Compusul revendicat manifestă proprietăți de inhibitor al proliferării celulelor tumorale ale adenocarcinomului pancreatic Capan-1, carcinomului pulmonar NCI-H460, leucemiei mieloide cronice Hap-1, leucemiei limfoblastice acute DND-41, leucemiei mieloide acute HL-60, leucemiei mieloide cronice K-562 și limfomului non-Hodgkin Z-138. Toxicitatea redusă a compusului revendicat față de celulele normale a fost demonstrată în baza testelor de toxicitate asupra peștilor din specia *Danio rerio*.

Revendicări: 2

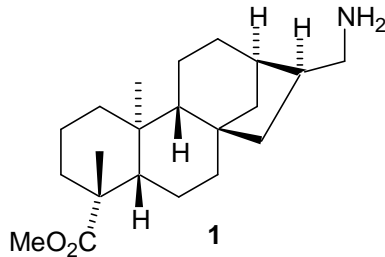
Figuri: 10

MD 4718 B1 2020.10.31

(54) Methyl *ent*-17-amino-kauran-19-oate with selective cytotoxic activity**(57) Abstract:**

The invention relates to chemistry and medicine, namely to a natural compound derivative which exhibits selective cytotoxic properties towards certain human cancerous cell lines and can be used as a chemotherapeutic agent in the treatment of certain oncologic diseases.

According to the invention, claimed is the methyl *ent*-17-amino-kauran-19-oate compound with the formula **1**.



The claimed compound exhibits the properties of pancreatic adenocarcinoma Capan-1, lung carcinoma NCI-H460, chronic myeloid leukemia Hap-1, acute lymphoblastic leukemia DND-41, acute myeloid leukemia HL-60, chronic myeloid leukemia K-56 and non-Hodgkin lymphoma Z-138 tumor cells proliferation inhibitor. The reduced toxicity of the claimed compound relative to normal cells was demonstrated on the basis of toxicity tests on fish of the *Danio rerio* species.

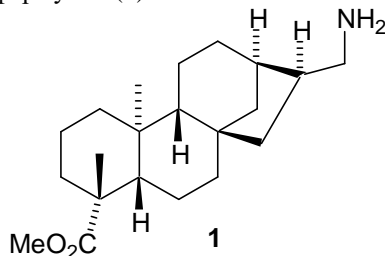
Claims: 2

Fig.: 10

(54) Метил *энт*-17-амино-кауран-19-оат с селективной цитотоксической активностью**(57) Реферат:**

Изобретение относится к химии и медицине, а именно к производному природного соединения, которое проявляет селективные цитотоксические свойства относительно некоторых линий раковых клеток человека и может быть использовано в качестве химиотерапевтического агента при лечении определенных онкологических заболеваний.

Согласно изобретению, заявляется соединение метил *энт*-17-амино-кауран-19-оат с формулой (1).



Заявленное соединение проявляет свойства ингибитора пролиферации опухолевых клеток аденокарциномы поджелудочной железы Capan-1, карциномы легких NCI-H460, хронического миелоидного лейкоза Hap-1, острого лимфобластного лейкоза DND-41, острого миелоидного лейкоза HL-60, хронического миелоидного лейкоза K-562 и лимфомы нон-Ходжкин Z-138. Пониженная токсичность заявленного соединения относительно нормальных клеток доказана на основе тестов токсичности на рыбах вида *Danio rerio*.

П. формулы: 2

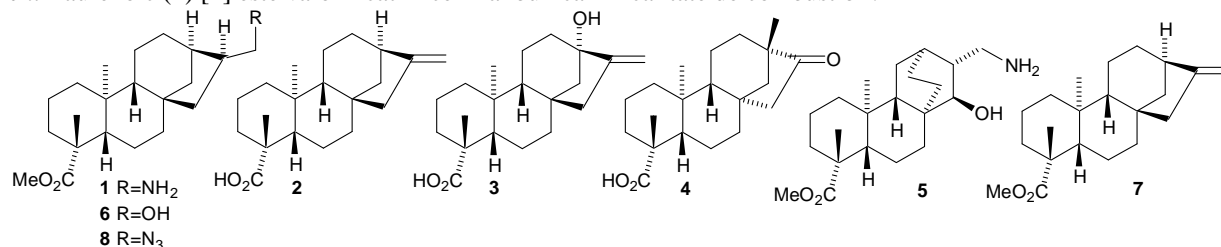
Фиг.: 10

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

5 Invenția se referă la chimie și medicină, și anume la un derivat al unui compus natural care manifestă proprietăți citotoxice selective față de unele linii de celule canceroase umane și poate fi utilizat în calitate de agent chimioterapeutic în tratarea anumitor maladii oncologice. În particular, este descris metil *ent*-17-amino-kauran-19-oatul (1) care este un derivat al acidului *ent*-kaurenoic (2) natural, disponibil pe larg din deșeurile de floarea soarelui (*Helianthus annuus*).

10 Diterpenoidele *ent*-kauranice sunt pe larg răspândite în plante, mai ales în speciile ce se utilizează în medicina tradițională chineză. Spectrul activităților biologice a acestei familii de compuși naturali este impresionant, incluzând activități antimicrobiene, antiinflamatorii, cardiovasculare, diuretice, citotoxice ș.a [1], [2]. Aceste proprietăți se datorează nu numai arhitecturii moleculare tetraciclice, dar și grupelor funcționale cu care este decorat scheletul carbonic. Ele asigură interacțiunea specifică a compusului cu masă moleculară mică cu receptorii celulelor vii, rezultând activități biologice ce pot fi utilizate în scopuri practice.

15 Disponibilitatea acestor compuși *ent*-kauranici funcționalizați este limitată în sursele naturale, de aceea s-au depus eforturi majore pentru sinteza derivaților *ent*-kauranici mai simpli bazându-se pe materiile prime disponibile [3]. Pot fi recunoscute două surse vegetale de bază a compușilor *ent*-kauranici care pot fi exploatate industrial: floarea soarelui (*Helianthus annuus*) și stevia (*Stevia rebaudiana*). Ambele reprezintă culturi industriale, prima este utilizată pentru producția uleiului vegetal, pe când a doua este cultivată în mod special pentru extragerea glicozidelor steviolului (3). Țesutul vegetal de floarea soarelui, ce conține o cantitate mare de acid *ent*-kaurenoic (2) [4] este valorificat în cel mai bun caz în calitate de combustibil.



Și acidul *ent*-kaurenoic (2), și steviolul (3) sunt slab funcționalizați, conținând doar o singură grupă funcțională în ciclul A și o grupă exometilenică în ciclul D. Steviolul (3) mai conține aditional o grupă terțiară hidroxil în poziția alilică a ciclului C. Însă aceste grupe funcționale pot fi manipulate cu succes pentru a genera o diversitate structurală.

30 Exemple recente de astfel de compuși au fost prezentate în câteva publicații ce se referă la diferite proprietăți terapeutice. Derivații citotoxici ai steviolului (3) au fost demonstrați de Ukiya et.al. [5]. Modificarea compusului natural original a fost realizată prin reacția de reducere a grupei carboxilice, urmată de derivatizarea alcoolului primar obținut cu diferiți agenți de acilare. Derivații acetati au demonstrat citotoxicitate puternică împotriva mai multor linii de celule canceroase (HL-60- leucemie, A549- plamini, AZ521-stomac, SK-BR-3- celule canceroase ale sanului) cu valori micromolare cu o singură cifră a IC₅₀. De remarcat faptul că sinteza chimică a steviolului din glicozidele naturale corespunzătoare nu este suficient de bine elaborată, odată ce hidroliza acidă a glicozidelor din stevia conduce la o transpoziție de schelet a (3), rezultând o transformare cantitativă în așa numitul *izo*-steviol (4). Spre deosebire de alcoolul (3), compusul regrupat (4) a fost subiectul unor modificări chimice intense, care a condus la obținerea mai multor compuși cu proprietăți terapeutice relevante, ca de exemplu acțiuni apoptotice [6], citotoxice [7], [8] și antiproliferative [9].

45 Transformările chimice a acidului *ent*-kaurenoic (2) au fost realizate în două direcții: modificarea grupei carboxilice a ciclului A și funcționalizarea legăturii duble, de regulă cu substituenți oxigenați [3]. S-a observat că sunt puține exemple de incorporare a azotului în cadrul ciclic al compusului (2). Grupele funcționale heteroatomice pe bază de azot sunt farmacofori relevanți în diterpenoidele biologic active și unele exemple relevante pot fi găsite în brevete. De exemplu, o amină diterpenică (5) cu structură atisanică a fost menționată într-un brevet american [10].

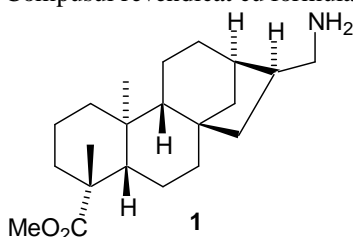
50 Compușii oxigenați cu structură similară au demonstrat activități biologice diferite. În special, esterul metilic (6) care este cel mai asemănător cu structura aminei (1) a fost izolat din

planta *Siegesbeckia glabrescens* (cunoscută ca "Hi-Chum" în Coreea) și brevetat ca un compus a unei compoziții farmaceutice pentru tratarea maladiilor gastrointestinale [11]. Spre deosebire de invenția actuală, nu a fost raportată citotoxicitatea esterului (6). Dezavantajul acidului *ent*-kaurenoic (2) inițial este legat de activitatea citotoxică foarte mică împotriva liniilor de celule

5 caneroase pancreatice (PANC-1) cu $IC_{50} = 0,52$ M [12].
 Problema soluționată de invenție constă în identificarea unui derivat nou al compusului natural pe bază de acid *ent*-kaurenoic, disponibil pe larg din deșeurile de floarea soarelui (*Helianthus annuus*), totodată derivatul să posede o activitate citotoxică înaltă împotriva liniilor de celule tumorale umane și un indice de selectivitate relevant în comparație cu celulele normale, față

10 de care derivatul propus nu trebuie să manifeste toxicitate sau toxicitatea cărui este redusă.
 Soluția pentru această problemă este oferită de compusul revendicat (1), identificat în urma modificării chimice a compusului diterpenic natural acidul *ent*-kaurenoic (2), care cuprinde metilarea grupei carboxilice și introducerea grupei funcționale amine la atomul de carbon C-17 al scheletului terpenic tetraciclic.

15 Compusul revendicat cu formula 1:



manifestă proprietăți de inhibitor al proliferării următoarelor celule tumorale: Capan-1 (adenocarcinom pancreatic), NCI-H460 (carcinom pulmonar), Hap-1 (leucemie mieloidă cronică), DND-41 (leucemie limfoblastică acută), HL-60 (leucemie mieloidă acută), K-562 (leucemie mieloidă cronică) și Z-138 (limfom non-Hodgkin). Selectivitatea acțiunii compusului revendicat a fost demonstrată de testele de toxicitate *in vitro* față de celule normale de retină umană (hTERT RPE-1) și *in vivo* față de peștii din specia *Danio Rerio* (zebrafish).

20
 25 Esența invenției constă în aceea că din nenumărate căi posibile de funcționalizare a acidului *ent*-kaurenoic s-a identificat un derivat de amină, care manifestă citotoxicitate selectivă contra Capan-1 (adenocarcinom pancreatic), NCI-H460 (carcinom pulmonar), Hap-1 (leucemie mieloidă cronică), DND-41 (leucemie limfoblastică acută), HL-60 (leucemie mieloidă acută), K-562 (leucemie mieloidă cronică) și Z-138 (limfom non-Hodgkin).

În particular, compusul funcționalizat reprezintă metil *ent*-17-amino-kauran-19-oatul (1) care este un derivat al acidului *ent*-kaurenoic (2) natural, disponibil pe larg din deșeurile de floarea soarelui (*Helianthus annuus*). Acesta conține o grupă amină adițională la structura de bază a acidului *ent*-kaurenoic (2). Se demonstrează, că această modificare chimică a compusului natural, de rand cu esterificarea grupei carboxilice a condus la o activitate citotoxică împotriva diferitor linii de celule tumorale (prezentate în tabelul de mai jos), inclusiv de tip Capan-1 (adenocarcinom pancreatic) și NCI-H460 (carcinom pulmonar) la valori submicromolare a IC_{50} .

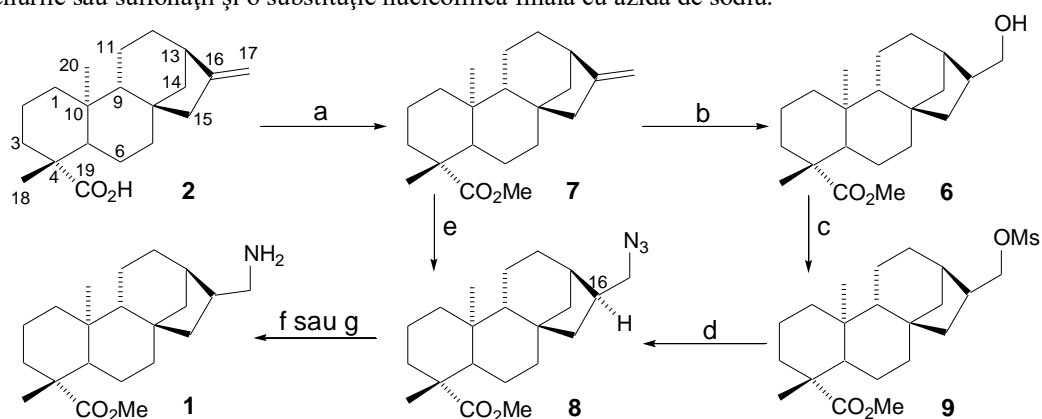
30
 35 Compusul revendicat are schelet carbonic al esterului *ent*-kaurenoic cunoscut (7), și conține grupa amină introdusă în mod selectiv la atomul de carbon C-17 al scheletului *ent*-kauranic. Amina (1) poate fi obținută prin diferite metode, inclusiv aminarea reductivă a compușilor carbonilici, mai comod prin reducerea azidei (8), derivată din esterului *ent*-kaurenoic (7), cu ajutorul diferitor agenți de reducere, așa ca trifenilfosfina, Raney-Ni sau hidrogen gazos în prezența unui catalizator de metale nobile, preferabil paladiu (10%) impregnat pe cărbune activ.

40
 45 Investigarea profilului activității biologice a aminei (1) a demonstrat citotoxicitate relevantă împotriva catorva linii de celule tumorale, inclusiv Capan-1 (adenocarcinom pancreatic) și NCI-H460 (carcinom pulmonar) la o concentrație de 10^{-7} Mol/L. Paralel, s-au efectuat teste de toxicitate *in vivo*, utilizând pești din specia *Danio Rerio* (zebrafish) care au arătat o toxicitate neglijabilă a compusului revendicat (1).

Avantajul compusului revendicat este structura sa chimică bazată pe compusul natural diterpenic și o procedură sintetică simplă cu un număr mic de etape, disponibilitatea nelimitată a materiei prime din resursele vegetale regenerabile care reprezintă o cultură industrială dominantă în zona europeană.

50 Cel mai relevant avantaj este activitatea citotoxică înaltă și toxicitatea scăzută, după cum a fost demonstrat în testele de toxicitate.

Materia primă pentru obținerea compusului revendicat (**1**) a fost reziduu vegetal după recoltarea florii soarelui, din care a fost izolat acidul *ent*-kaurenoic (**2**) [4]. Metilarea acidului (**2**) cu o soluție eterică de diazometan a condus la obținerea esterului (**7**), care apoi a fost transformat în azida (**8**). Sinteza compusului (**8**) poate fi realizată prin diferite strategii. Calea tradițională de transformare a olefinei în azidă include o secvență de hidroborare-oxidare care conduce la formarea alcoolului primar, urmată de transformarea grupei hidroxil într-un nucleofug eficient ca halogenurile sau sulfonații și o substituție nucleofilică finală cu azida de sodiu.



Schemă. Reagenți și condiții: a) CH_2N_2 , Et_2O , qant.; b) 1. $\text{BH}_3\text{-Me}_2\text{S}$, THF; 2. NaOH, H_2O_2 , 86%; c) MsCl, Et_3N , DCM; d) NaN_3 , DMF, 76% în două etape; e) 1. HBCat, DMA, DCM; 2. 3-PySO₂N₃, DTBHN, DMF, 67%; f) Ph_3P , THF, H_2O , 77%; g) H_2 (1 atm.), EtOAc, 10% Pd/C, 50%.

Această secvență a fost efectuată pornind de la esterul olefinic (**7**) și azida dorită s-a obținut cu un randament de 65% în 3 etape (schemă). Mezilatul (**9**) a fost utilizat ca activator al alcoolului primar (**6**) pentru substituția finală $\text{S}_{\text{N}}2$ cu nucleofilul de azidă.

O cale sintetică de alternativă mai scurtă a fost de asemenea realizată cu scopul obținerii azidei dorite (**8**) conform metodei „one pot” în două etape, bazându-se pe procedura de hidroazidare radicalică anti-Markovnikov. Aceasta include hidroborarea cu catecholboran, urmată de scindarea radicalică a esterului boronat rezultat în prezența unei surse a radicalului de azidă. Atât fenilsulfonilazida, cât și piridilsulfonilazida au fost aplicate cu succes la etapa finală de azidare. Procedura „one pot” a condus la un randament puțin mai mare a azidei (**8**) pe o cale sintetică mai scurtă.

Transformarea azidei (**8**) în amina (**1**) a fost realizată prin reducere cu diferiți agenți, inclusiv trifenilfosfina și hidrogenul gazos. În particular, hidrogenarea catalitică în prezența a 10% paladiu pe carbon s-a dovedit a fi cel mai convenabil mijloc sintetic pentru obținerea compusului (**1**) din (**8**).

Structura azidei (**8**) și a aminei (**1**) a fost determinată univoc cu ajutorul metodelor moderne de analiză (RMN, IR, MS). Stereochimia absolută a azidei (**8**) la centrul chiralic C-16 nou format a fost confirmată prin metoda difracției cu raze X pe monocristal (fig. 1).

Evaluarea activității citotoxice a aminei (**1**) a fost demonstrată pe o grupă de celule tumorale ce sunt prezentate în Tabel. Citotoxicitatea demonstrată a compusului revendicat este mai superioară decât cea a cisplatinei, care este considerată un medicament de referință în diferite studii a citotoxicității (conform datelor Institutului Sanger: <https://www.cancerrxgene.org/>) iar valorile IC_{50} pentru liniile de celule tumorale selectate sunt comparabile cu midostaurina comercială, care este un inhibitor polivalent al protein kinazei, fiind la moment investigat în contextul tratării leucemiei mieloid acute, a sindromului mielodisplastic și a mastocitozei sistemice.

Se cunoaște, că toxicitatea reprezintă un dezavantaj major al agenților chimioterapeutici moderni iar potențialul aminei (**1**) de a demonstra un indice terapeutic a fost evaluat pe testele *in vitro* și *in vivo* de toxicitate. Testul *in vitro* a fost efectuat pe celule de retină non-canceroase (hTERT RPE-1), iar valorile rezultante ale IC_{50} au fost mai ridicate de câteva ori (până la zece ori) decât liniile selectate de celule tumorale. Această proprietate extraordinară a aminei (**1**) a fost confirmată cu ajutorul experimentelor de toxicitate *in vivo* utilizând peștii din specia *Danio rerio*. Modificări morfologice a speciilor investigate nu s-au identificat într-o gamă largă de concentrații. Amina revendicată (**1**) este un compus stabil în aer și la umiditate, solubil în DMSO și alți solvenți organici sau soluții apoase la un pH acid.

În continuare invenția se explică prin desenele din fig. 1-10, care reprezintă:

- fig.1, structura azidei **8** determinată prin metoda difracției cu raze X.;
- fig.2, spectrul IR al azidei **8**;
- fig.3, spectrul ¹H RMN al azidei **8**;
- 5 - fig.4, spectrul ¹³C RMN al azidei **8**;
- fig.5, spectrul IR al aminei **1**.
- fig.6, spectrul ¹H RMN al aminei **1**;
- fig.7, spectrul ¹³C RMN al aminei **1**;
- fig.8, rezultatele testării toxicității *in vivo* a aminei **1**;
- 10 - fig.9, fotografiile ale embrionilor *Danio Rerio* necrozați;
- fig.10, fotografiile ale larvelor *Danio Rerio* cu efecte ale acțiunii toxice, inclusiv (A) lipsa eclozării, (B) curbura larvelor și (C) prezența edemului cardiac.

Exemple de realizare a invenției

15 Sinteza chimică

Sinteza one-pot a metil-(4R,6aS,8R,9R,11aR,11bS)-8-(azidometil)-4,11b-dimetiltetradecahidro-6a,9-metanociclohepta[*a*]naftalen-4-carboxilatului (**8**) din esterul (**7**)

La soluția formată din esterul (**7**) (350 mg, 1.1 mmol) și DMA (0.01 mL, 0.11 mmol) în CH₂Cl₂ (2 mL) se adaugă cu picătura cateholboranul (0.35 mL, 3.3 mmol) la 0 °C sub azot. Reacția se refluxează timp de 5 ore, apoi se adaugă *i*-PrOH (0.2 mmol) la 0 °C pentru a dizolva excesul de CatBH. După evaporarea solventului în vid, la soluție se adaugă DMF (2 mL), 3-PySO₂N₃ (607 mg, 3.3 mmol), DTBHN (19 mg, 0.11 mmol) și se agită la 80 °C. După 2-3 ore soluția se înnegrește și este purificată pe o coloană cromatografică cu oxid de aluminiu pentru a elimina reziduurile de bor utilizând Et₂O ca eluent. Filtratul este spălat cu apă și uscat pe Na₂SO₄ anhidru. Produsul crud a fost supus cromatografiei pe coloană cu silicagel (hexan/EtOAc 98:2) obținându-se azida (**8**) (265 mg, 67%). P.top. 97-99 °C. $[\alpha]_D^{20} = -46^{\circ}$ (*c*= 0.54, CHCl₃). IR (film lichid, cm⁻¹, fig. 2): 2926, 2095, 1718, 1264, 1113, 727. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃, fig. 3) δ: 3.63 (*s*, Me(20)); 3.28-3.38 (*m*, CH₂(17)); 1.16 (*s*, Me(18)); 0.81 (*s*, Me(21)). ¹³C- RMN (101 MHz, CDCl₃, fig. 4) δ: 178.05 (*s*, C(19)); 56.93 (*d*, C(5)); 56.23 (*d*, C(9)); 52.85 (*t*, C(17)); 51.11 (*q*, C(20)); 44.51 (*t*, C(15)); 44.43 (*s*, C(4)); 43.79 (*s*, C(8)); 41.91 (*t*, C(7)); 40.73 (*t*, C(11)); 40.20 (*t*, C(14)); 40.05 (*d*, C(13)); 39.41 (*s*, C(10)); 38.06 (*t*, C(3)); 37.62 (*d*, C(16)); 28.71 (*q*, C(18)); 25.89 (*t*, C(12)); 22.14 (*t*, C(6)); 19.09 (*t*, C(2)); 19.04 (*t*, C(11)); 15.33 (*q*, C(21)). GCMS *m/z* calculat pentru [C₂₁H₃₃N₃O₂]⁺: 359.25; s-a găsit 318 [M⁺ -N₃]. Analiza elementală pentru C₂₁H₃₃N₃O₂ (359.25): C, 70.16; H, 9.25; N, 11.69; O, 8.90; s-a găsit C, 70.22; H, 9.29; N, 11.74; O, 9.10.

Metil-(4R,6aS,8R,9R,11aR,11bS)-8-(hidroximetil)-4,11b-dimetiltetradecahidro-6a,9-metanociclohepta[*a*]naftalen-4-carboxilat (**6**)

La substratul (**7**) (100 mg, 0.31 mmol) dizolvat în THF (1.5 mL) se adaugă BH₃-Me₂S (0.15 mL, 1.5 mmol) la 0 °C în condiții inerte. Reacția se agită la temperatura camerei timp de 3 ore. Apoi se adaugă NaOH 15% (4 mL), H₂O₂ 35% (4 mL) și se lasă peste noapte. Se prelucrează cu H₂SO₄ 10%, se neutralizează, se usucă pe Na₂SO₄ anhidru. Produsul crud a fost supus cromatografiei pe coloană cu silicagel (hexan/EtOAc 95:5) obținându-se alcoolul (**6**) (89 mg, 86%). $[\alpha]_D^{20} = -37.2^{\circ}$ (*c*= 0.8, CHCl₃). IR (film lichid, cm⁻¹): 3357, 2918, 2849, 1725, 1462, 1235, 1154, 1033, 755. ¹H- RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.69-3.72 (*m*, CH₂(17)); 3.63 (*s*, Me(20)); 1.15 (*s*, Me(18)); 0.80 (*s*, Me(21)). ¹³C- RMN (101 MHz, CDCl₃) δ: 178.11, 64.28, 56.96, 56.41, 51.10, 44.23, 43.79, 43.59, 43.25, 42.07, 40.74, 40.34, 39.41, 38.08, 36.91, 28.72, 26.01, 22.21, 19.15, 19.11, 15.34. GCMS *m/z* calculat pentru [C₂₁H₃₄O₃]⁺: 334.25; s-a găsit 334.2. Analiza elementală pentru C₂₁H₃₄O₃ (334.25): C, 75.41; H, 10.25; O, 14.35; s-a găsit C, 75.45; H, 10.42; O, 14.36.

Metil-(4R,6aS,8R,9R,11aR,11bS)-8-(azidometil)-4,11b-dimetiltetradecahidro-6a,9-metanociclohepta[*a*]naftalen-4-carboxilat (**8**) din alcoolul (**6**)

La alcoolul (**6**) (50 mg, 0.15 mmol) dizolvat în CH₂Cl₂ (1.4 mL) s-a adăugat Et₃N (0.12 mL, 0.9 mmol) și MsCl (0.05 mL, 0.75 mmol). Reacția se agită la 0 °C timp de 2 ore. Se extrage cu Et₂O, se spală cu NaCl (sol. sat.) și se usucă pe Na₂SO₄ anhidru. La produsul crud (59 mg, 0.14 mmol) dizolvat în DMF (1.5 mL) s-a adăugat NaN₃ (35 mg, 0.54 mmol). Reacția s-a agitat timp de 12 ore la 80 °C, apoi s-a extras cu Et₂O, se spală cu NaCl (sol.sat) și se usucă pe Na₂SO₄. Produsul crud a fost supus cromatografiei pe coloană cu silicagel (hexan/EtOAc 98:2) obținându-se azida (**8**) (46 mg, 86%).

Metil-(4R,6aS,8R,9R,11aR,11bS)-8-(aminometil)-4,11b-dimetiltetradecahidro-6a,9-metanociclohepta[*a*]naftalen-4-carboxilat (1), procedura f.

La soluția formată din azida (8) (50 mg, 0.14 mmol) în THF (1 mL) s-a adăugat Ph₃P (55 mg, 0.21 mmol) și apă (50 mg, 2.8 mmol). Amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei peste noapte, apoi solventul se evaporă la rotor și amestecul reactant se purifică cromatografic (CH₂Cl₂ /MeOH 98:2) obținându-se amina (1) (36 mg, 77%). $[\alpha]_D^{20} = -22^\circ$ ($c = 0.6$, CHCl₃). IR (film lichid, cm⁻¹, fig. 5): 2928, 2851, 1720, 1548, 1404, 1230, 1149, 1016, 735. ¹H- RMN (400 MHz, CDCl₃, fig. 6) δ : 8.28 (*bs*, NH₂), 3.63 (*s*, Me(20)); 3.05 (*bs*, CH₂(17)); 1.15 (*s*, Me(18)); 0.79 (*s*, Me(21)). ¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃, fig. 7) δ : 177.97, 56.89, 55.88, 51.13, 44.68, 44.17, 43.76, 41.70, 41.27, 40.68, 40.14, 39.38, 38.65, 38.02, 37.25, 28.73, 25.74, 22.12, 19.07, 18.84, 15.29. GCMS m/z calculat pentru [C₂₁H₃₅NO₂]⁺: 333.26; s-a determinat 333.2. Analiza elementală pentru C₂₁H₃₅NO₂ (333.26): C, 75.63; H, 10.58; N, 4.20; O, 9.59; s-a determinat C, 75.66; H, 11.03; N, 4.21; O, 10.03.

Metil-(4R,6aS,8R,9R,11aR,11bS)-8-(aminometil)-4,11b-dimetiltetradecahidro-6a,9-metanociclohepta[*a*]naftalen-4-carboxilat (1), procedura g.

La soluția formată din azida (8) (50 mg, 0.14 mmol) în EtOAc (2 mL) s-a adăugat 10% Pd/C (14.7 mg, 0.014 mmol) și reacția a fost vacuumată apoi barbotată cu hidrogen (s-a repetat de 3 ori). După aceasta reacția s-a agitat la temperatura camerei în atmosferă de hidrogen timp de 20 ore, apoi s-a filtrat, catalizatorul s-a spălat cu EtOAc (10 mL) și solventul s-a evaporat la rotor. Produsul crud s-a purificat cromatografic pe o coloană cu silicagel (CH₂Cl₂ /MeOH 98:2) obținându-se amina (1) (26 mg, 50%).

Tabel

Activitatea citotoxică a aminei 1 față de liniile de celule selectate

Compus	Unit. conc.	IC ₅₀								
		hTERT RPE-1	Capan-1	Hap-1	HCT-116	NCI-H460	DND-41	HL-60	K-562	Z-138
1	μM	7.7	0.8	1.8	1.1	0.7	1.7	2.0	8.3	1.2
Docetaxel	nM	18.7	4.2	4.5	2.2	5.5	4.7	5.9	5.2	3.7
Staurosporin a	nM	1.0	6.2	1.3	1.5	2.2	8.6	9.1	27.9	6.7

25

Testele de toxicitate *in vitro*

Tulpinile celulare HL-60, K-562, Z-138, Capan-1, HCT-116, NCI-H460 au fost achiziționate de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, SUA), cu excepția tulpinilor DND-41, care au fost procurate de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ Leibniz-Institut, Germania). Toate tulpinile celulare au fost menținute conform recomandărilor de la furnizori. Mediile de cultură au fost procurate de la Gibco Life Technologies, SUA, fiind ulterior suplimentate cu 10% ser fetal de bovine (HyClone, GE Healthcare Life Sciences, SUA). Compușii de referință citotoxici staurosporina și docetaxelul au fost obținuți de la Selleckchem (Munich, Germania). Toate soluțiile stock au fost preparate în DMSO.

Citotoxicitatea compusului revendicat (1) a fost determinată conform metodei de imagistică în timp real pe microplașe cu 384 godeuri cu pereți negri și fundul transparent (Greiner) în analize repetitive duble. Tulpinile celulare aderente, Capan-1, HCT-116 și NCI-H460 au fost însămânțate la o densitate între 500 și 1500 celule per godeu, iar tulpinile suspendate DND-41, HL-60, K-562 și Z-138 au fost însămânțate la o densitate între 2500 și 5500 celule per godeu. După incubarea pe durata nopții, tulpinile celulare au fost tratate cu compușii testați în concentrații diferite, pornind de la 100 la 6.4 x 10⁻³ μM. Microplașele au fost incubate la 37 °C și monitorizate 72 ore într-un dispozitiv IncuCyte® (Essen BioScience Inc., Ann Arbor, MI) pentru imagistică în timp real. În calitate de standard de referință cu activitate citotoxică cunoscută au fost utilizați docetaxelul și staurosporina. Imaginile au fost înregistrate în proiecții singulare la fiecare trei ore cu o amplificare optică de 10 ori. Multiplicarea celulelor a fost cuantificată în baza procentului de confluență celulară după cum a fost analizat de dispozitivul IncuCyte®. Valorile IC₅₀ au fost determinate în baza valorilor AUC. Estimarea indicelui de selectivitate a fost bazată pe citotoxicitatea demonstrată față de celulele normale de retină umană hTERT RPE-1. Valorile medii ale IC₅₀ sunt prezentate în Tabel.

50

Testele de toxicitate *in vivo*

Peștii adulți (tip sălbatic, wild type Tübingen) au fost menținuți, hrăniți și reproduși la instalația acvatică model din cadrul ICB, aprobată de Ministerul Sănătății al Italiei (codul instalației nr. 20/2016-UT), folosind procedurile aprobate de comitetul de etică animală (OPBA) la Institutul de Chimie Biomoleculară (ICB), în conformitate cu ghidurile și regulamentele naționale. Pentru testul toxicologic *in vivo*, embrionii *D. rerio* au fost obținuți prin fregolare naturală și maturați conform procedurii Kimmel. Testele au fost apoi efectuate, în conformitate cu legislația europeană (Directiva UE 2010/63 / UE), conform căreia embrionii de pești nu sunt considerați animale experimentale până la 120 de ore după fertilizare, deoarece nu se hrănesc independent. Embrionii obținuți din împerechere au fost distribuiți în duplicat a câte 6 embrioni în 1 ml într-o placă cu 24 celule (well plate). Tratamentele au început de la 3-4 ore după fertilizare (hpf) până la 72 hpf. Compusul a fost dizolvat în DMSO și diluat până la concentrația testată în mediu embrionar (0,3 g/L OceanSalt (sare de mare) și 2 mg/L albastru de metilen). Cantitatea de solvent nu a depășit 0,4% și mediile care conțin compusul de interes au fost reinnoite, iar efectele observate au fost înregistrate zilnic. Viabilitatea embrionilor și aspectul morfologic au fost evaluate la un stereomicroscop disecționant. La sfârșitul timpului de expunere, larvele au fost eutanasiate prin supradozaj de Tricaine (MS-222, Sigma-Aldrich), iar fotografiile diferitor aspecte morfologice au fost realizate la un microscop de disecție (Stemi 305, Zeiss) echipat cu AxioCam 105 color (Zeiss) în metilceluloză. Rezultatele sunt prezentate în fig. 8. Mortalitatea a fost calculată după următorii parametri: coagularea embrionilor (fig.9), absența bătăii de inimă și lipsa răspunsului la atingere. Toxicitatea a fost evaluată în conformitate cu incidența următoarelor condiții (fig.10):

(A) lipsa eclozării, (B) curbura larvelor și (C) prezența edemului cardiac.

La concentrații mai joase de 20 μ M, nu a fost înregistrat niciun semn de toxicitate în comparație cu proba de control (embrion mediu și vehicul). La o concentrație de 20 μ M, amina (1) a început să inducă o anumită toxicitate: 36% de embrioni tratați erau încă în corion (fig.10A), ceea ce se considera o întârziere în dezvoltarea larvelor, pe când 55% din embrioni prezentau un fenotip curbat (fig.10B).

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Ghisalberty E. L. The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. *Fitoterapia*, 1997, vol. 68, p. 303-325
2. Villa-Ruano N., Lozoya-Gloria E., Pacheco-Hernandez Y. Kaurenoic acid: a diterpene with a wide range of biological activities. *Studies in natural products chemistry*, 2016, vol. 51, p. 151-174
3. Morarescu O. Synthetic transformations of ent-kaurenoic acid. *Chemistry Journal of Moldova*, 2015, 10 (1), p. 9-19
4. Morarescu O., Grinco M., Dragalin I., Kulcički V., Ungur N. Study on extraction process of sunflower (*Helianthus Annuus L.*) dry wastes using different solvents. *Chemistry Journal of Moldova*, 2013, vol. 8, p. 90-93
5. Ukiya M., Sawada S., Kikuchi T., Kushi Y., Fukatsu M., Akihisa T. Cytotoxic and Apoptosis-Inducing Activities of Steviol and Isosteviol Derivatives against Human Cancer Cell Lines. *Chemistry & biodiversity*, 2013, vol. 10(2), p. 177-188
6. Malki A., Laha R., Bergmeier S.C. Synthesis and cytotoxic activity of MOM-ether analogs of isosteviol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2014, vol. 24(4), p. 1184-1187
7. Zhang T., Lu L.H., Liu H., Wang J.W., Wang R.X., Zhang Y.X., Tao J.C. D-ring modified novel isosteviol derivatives: Design, synthesis and cytotoxic activity evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2012, vol. 22(18), p. 5827-5832
8. Khaybullin R.N., Zhang M., Fu J., Liang X., Li T., Katritzky A.R., Okunieff P. and Qi X. Design and synthesis of isosteviol triazole conjugates for cancer therapy. *Molecules*, 2014, vol. 19(11), p. 18676-18689
9. Zhu S.L., Wu Y., Liu C.J., Wei C.Y., Tao J.C., Liu H.M. Design and stereoselective synthesis of novel isosteviol-fused pyrazolines and pyrazoles as potential anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, vol. 65, p. 70-82

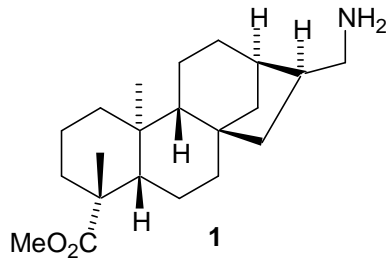
10. US 7211589 B2 2007.05.01

11. KR 101282003 B1 2013.07.04

12. Okoye T.C., Akah P.A., Nworu C.S., Ezike A.C. Kaurenolic acid isolated from the Root Bark of *Annona senegalensis* induces cytotoxic and antiproliferative effects against PANC-1 and HeLa cells. *European Journal of Medicinal Plants*, 2014, vol. 4(5), p. 579-589

(57) Revendicări:

1. Metil *ent*-17-amino-kauran-19-oat reprezentat prin formula 1:



2. Compus, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** manifestă proprietăți de inhibitor al proliferării celulelor tumorale ale adenocarcinomului pancreatic Capan-1, carcinomului pulmonar NCI-H460, leucemiei mieloide cronice Hap-1, leucemiei limfoblastice acute DND-41, leucemiei mieloide acute HL-60, leucemiei mieloide cronice K-562 și limfomului non-Hodgkin Z-138.

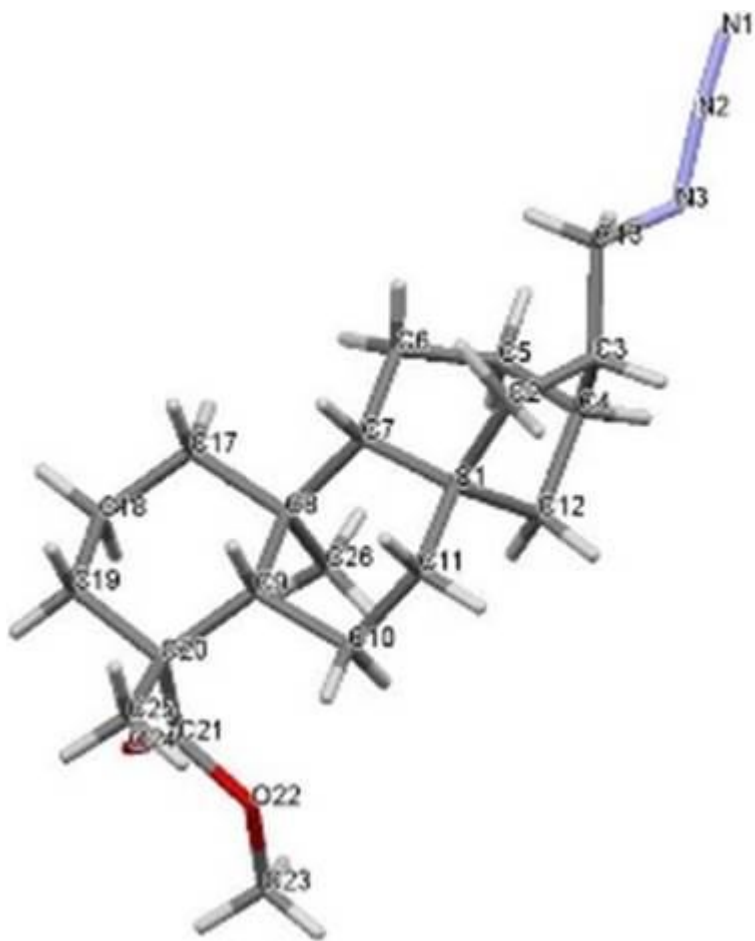


Fig. 1

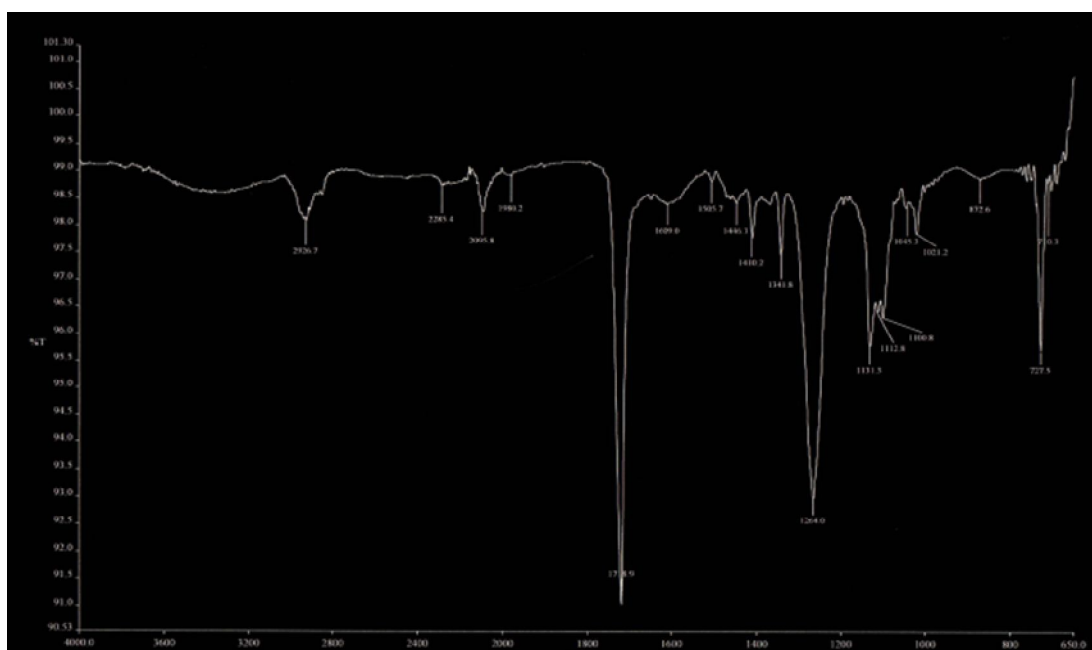


Fig. 2

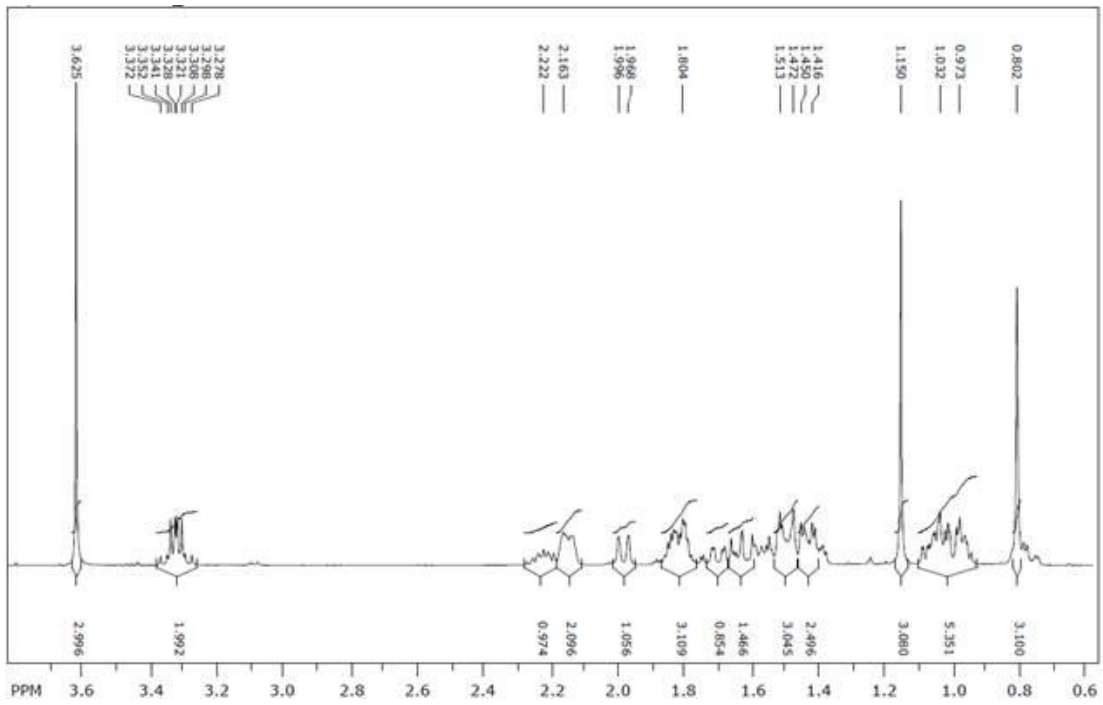


Fig. 3

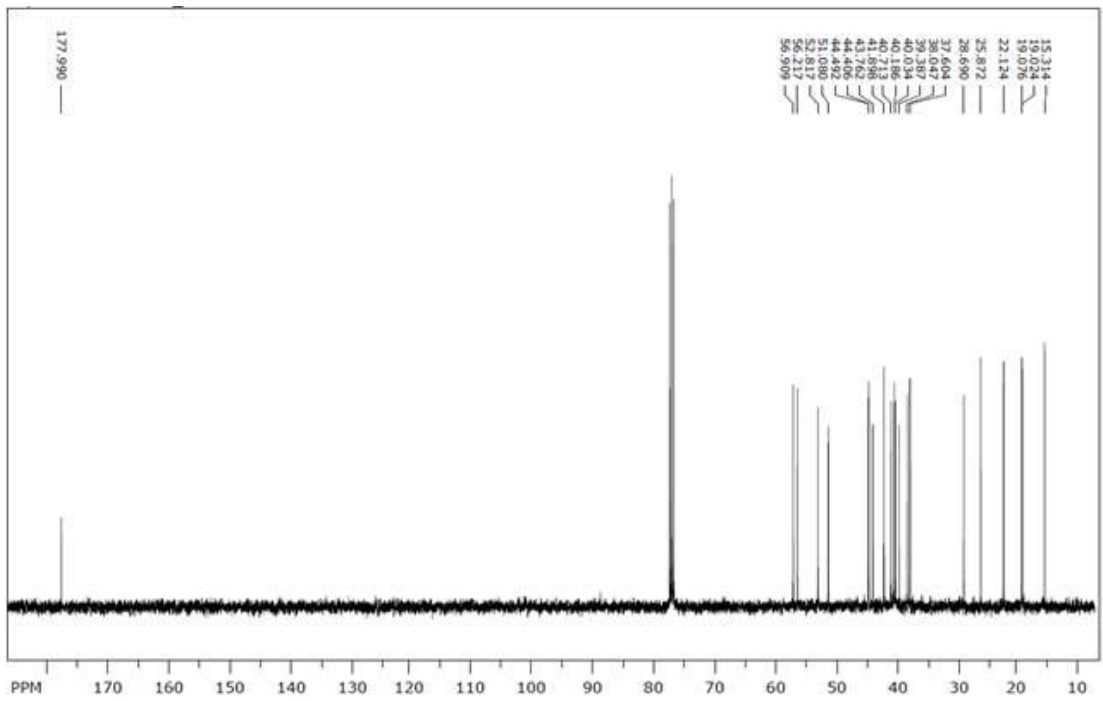


Fig. 4

MD 4718 B1 2020.10.31

12

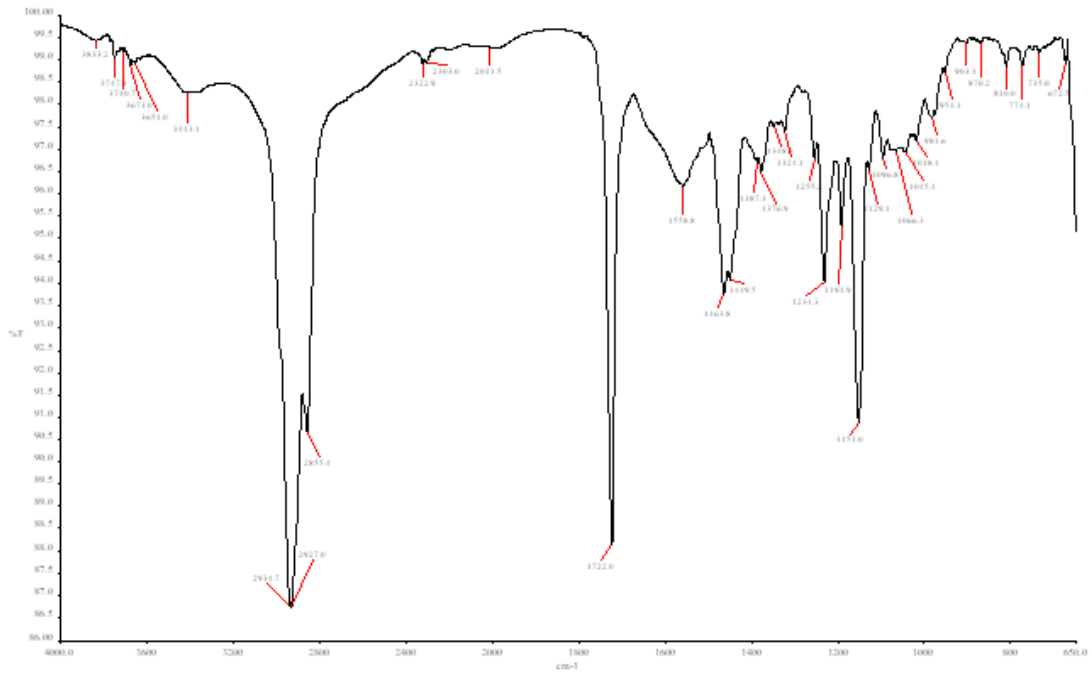


Fig. 5

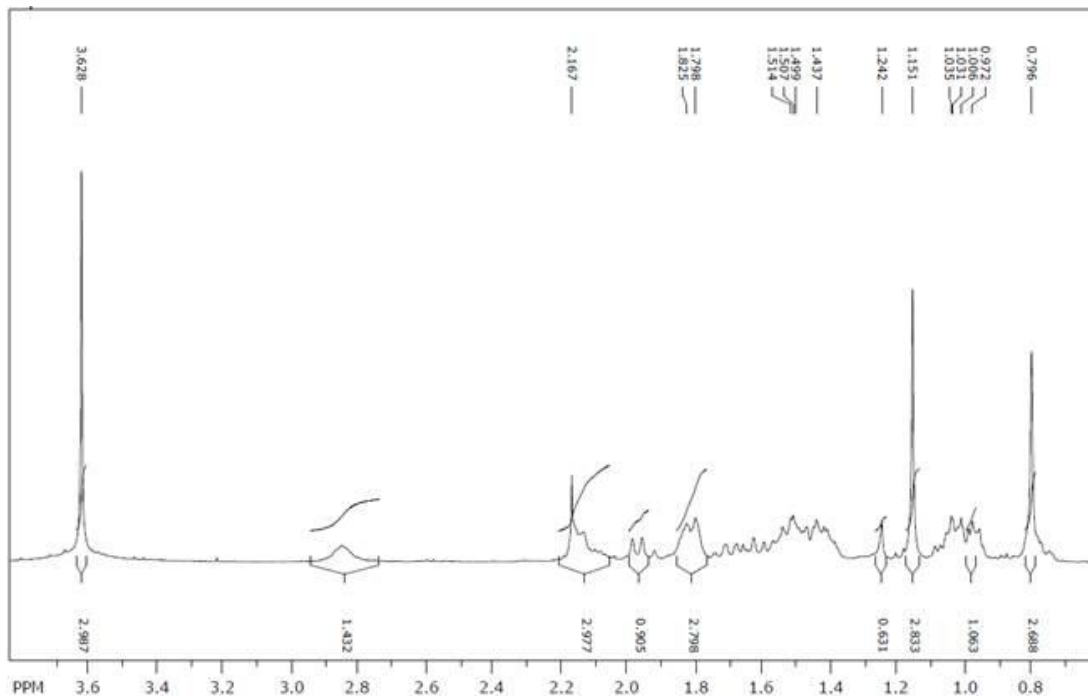


Fig. 6

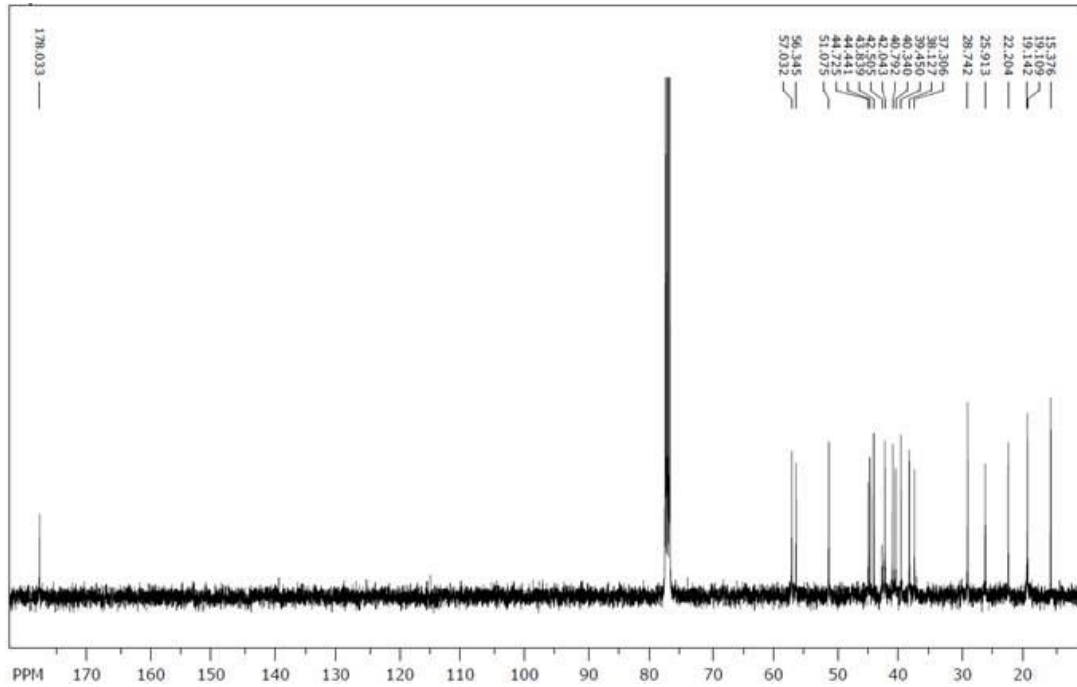


Fig. 7

Toxicitatea aminei (1)

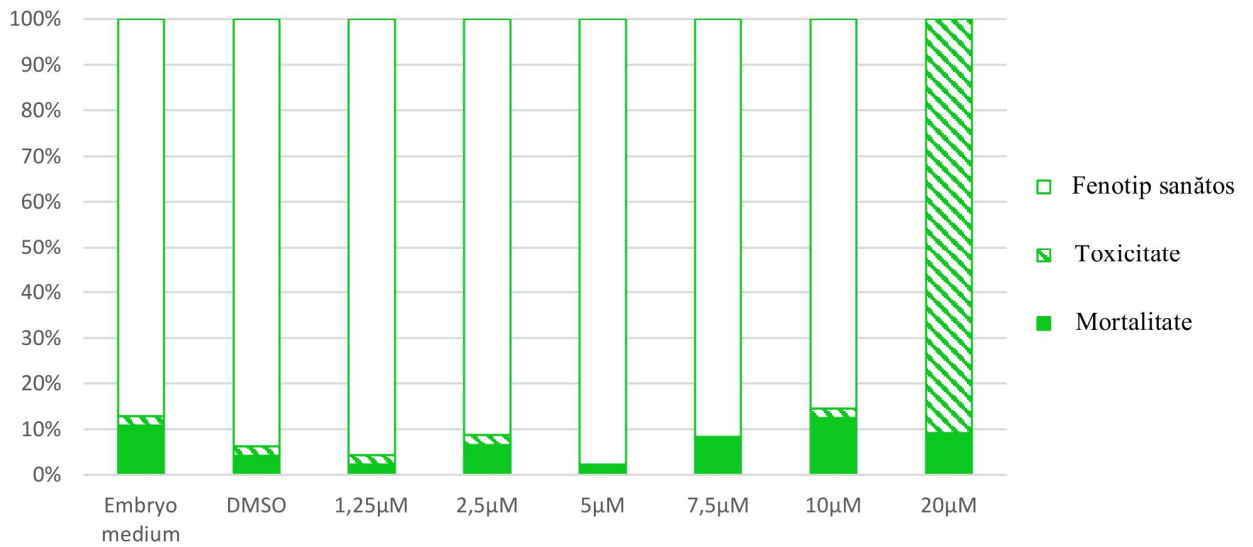


Fig. 8

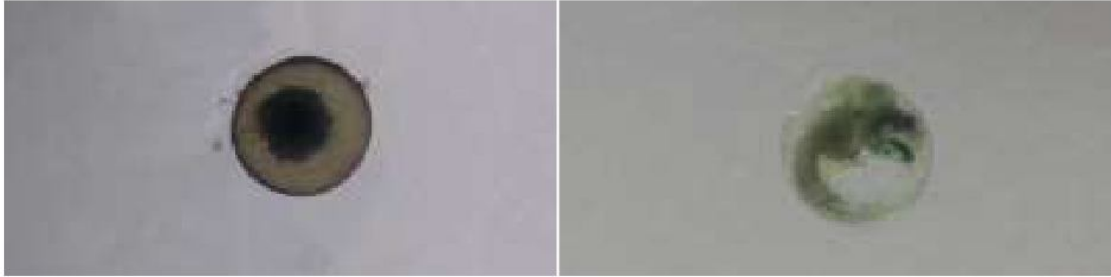


Fig. 9



Fig. 10