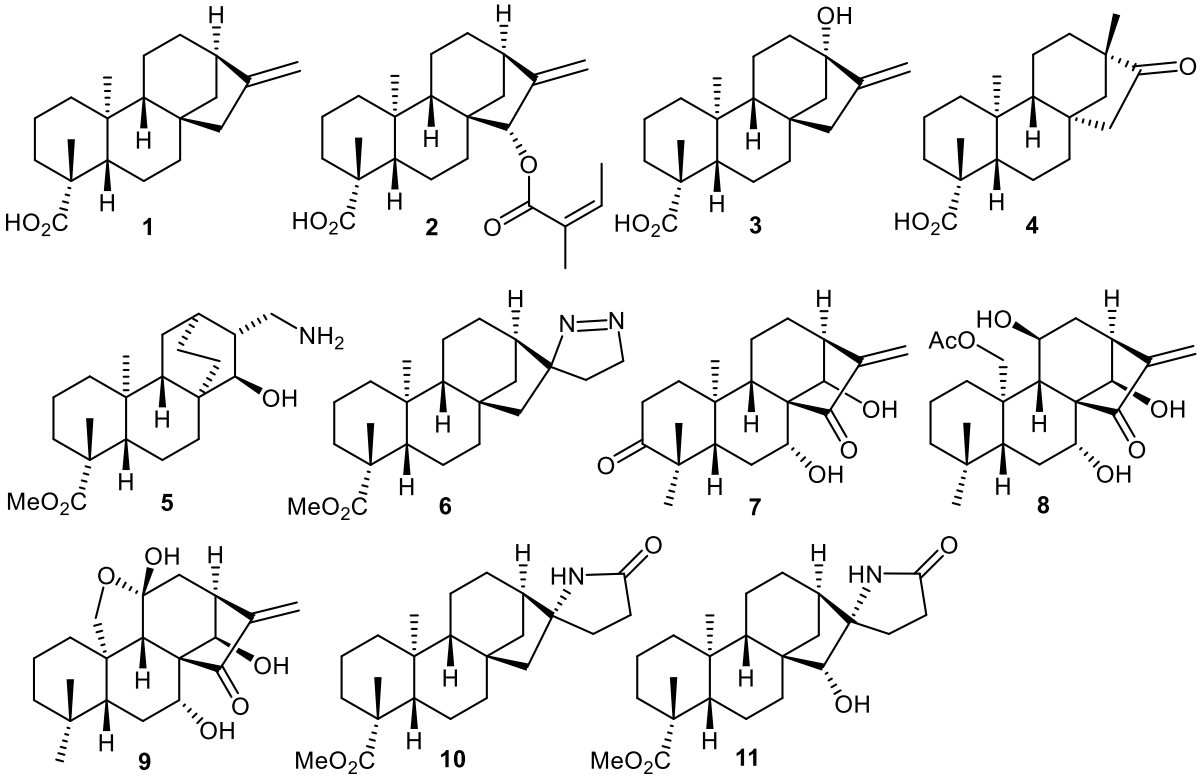
Invenţia se referă la chimia compuşilor naturali şi chimia medicinală, în special la sinteza şi utilizarea în calitate de agenţi chimioterapeutici pentru tratarea maladiilor canceroase a derivaţilor ce includ o grupă funcţională spiro γ-lactamică suplimentară la scheletul carbonic diterpenic extins al acidului *ent*-kaurenoic (1) – un component al extractului din deşeurile de floarea-soarelui (*Helianthus annuus*).

Lactamele reprezintă o clasă de compuşi chimici care şi-au găsit aplicaţii largi în elaborarea medicamentelor. Cel mai explorat exemplu este fragmentul β-lactamic, care reprezintă un reper al antibioticelor moderne. Pe lângă aceasta, alte lactame sunt foarte relevante din acest punct de vedere. În particular, γ-lactamele sunt farmacofori importanţi şi multe medicamente conţin această grupă funcţională [Caruano J., Muccioli G. G., Robiette R. Biologically active γ-lactams: synthesis and natural sources. Organic & Biomolecular Chemistry, 2016, 14(43), 10134-10156]. Unitatea heterociclică γ-lactamică poate fi integrată în structura medicamentului concret în diferite moduri: fie în formă condensată, spiro sau izolată. Lactamele condensate şi izolate sunt destul de răspândite, atât în medicamente cunoscute, cât şi în alţi compuşi sintetici de interes biologic relevant. Pe de altă parte, γ-lactamele spiro-fuzionate sunt foarte rare, iar potenţialul lor este slab explorat [Saldívar-González F.I., Lenci E., Trabocchi A. and Medina-Franco J.L. Exploring the chemical space and the bioactivity profile of lactams: a chemoinformatic study. RSC advances, 2019, 9(46), pp.27105-27116]. Prin urmare, integrarea unităţii γ-lactam spiro-fuzionate în cadrul compuşilor naturali accesibili reprezintă o cale convenabilă către noi entităţi chimice cu activitate biologică promiţătoare. În particular, utilizarea diterpenoidelor *ent*-kauranice în calitate de structuri disponibile pentru sinteza conjugatelor hibride terpenic-heterociclice este convenabilă în mod deosebit. Ţesutul vegetal de floarea-soarelui (*Helianthus Annuus*), ce reprezintă în prezent deşeuri după recoltare, conţine o cantitate mare de acid *ent*-kaurenoic (1) şi *ent*-15-angeloyloxi-16-kaurenoic (2), care pot fi obţinuţi în cantităţi preparative [Morarescu O., Grinco M., Dragalin I., Kulciţki V., Ungur N. Study on extraction process of sunflower (*Helianthus Annuus* L.) dry wastes using different solvents. Chem. J. Moldova, 2013, 8, 90-93; Grinco M., Chetraru O., Kulciţki V., Barba A., Boico A., Vlad P. F., Ungur N. C15 functionalized derivatives of *ent*-kaur-16-en-19-oic acid: isolation from the sunflower Helianthus annuus L. and synthesis. Chem. J. Moldova, 2010, 5, p. 106 – 108].

Exemplele recente ale altor compuşi *ent*-kauranici ce posedă diferite proprietăţi terapeutice au fost descrise în mai multe publicaţii. Derivaţii citotoxici ai steviolului (3) au fost descrişi de Ukiya et al. [1]. Modificarea compusului natural a fost efectuată prin reducerea fragmentului carboxilic, urmată de derivatizarea alcoolului primar rezultant cu diferiţi agenţi de acilare. Derivaţii O-acilaţi au prezentat citotoxicitate puternică împotriva mai multor linii de celule canceroase (celule canceroase de HL60- leucemie, A549 –pulmonare, AZ521 – stomac, SK-BR-3 –mamare) cu valori micromolare de IC_{50} cu o singură cifră. Un dezavantaj evident al acestor derivaţi este faptul că sinteza chimică a steviolului din glicozidele naturale corespunzătoare nu este suficient de bine elaborată, hidroliza acidă a glicozidelor din stevia conduce la o regrupare de schelet a compusului (3), rezultând o conversie cantitativă la aşa-numitul izo-steviol (4). Spre deosebire de alcoolul (3), compusul regrupat (4) a fost subiectul unor intense modificări chimice care a condus la obţinerea mai multor substanţe cu proprietăţi terapeutice relevante, inclusiv apoptotice [2], citotoxice [3], [4] şi antiproliferative [5]. Puţine date sunt însă disponibile cu privire la factorul de selectivitate [6] al acestor derivaţi raportaţi.



Transformările chimice ale acidului ent-kaurenoic (1) s-au efectuat în două direcţii: modificarea grupului carboxilic din ciclul A şi funcţionalizarea legăturii duble cu substituenţi oxigenaţi [Morarescu O. Synthetic transformations of *ent*-kaurenoic acid. Chem. J. Moldova, 2015, 10 (1), 9-19]. Dezavantajul acidului *ent*-kaurenoic (1) este legat de o citotoxicitate modestă, în special o citotoxicitate foarte scăzută împotriva liniilor celulare de cancer pancreatic (PANC-1) cu IC_{50} = 0,52 M [7].

Au fost relatate puţine date despre introducerea atomului de azot în scheletul carbonic al compusului (1). Grupele funcţionale heteroatomice cu azot sunt farmacofori relevanţi în diterpenoidele biologic active şi exemple similare pot fi găsite în o serie de brevete. De exemplu, o amină diterpenică (5) de structură atisanică a fost menţionată într-un brevet SUA [US7211589 B2 2007.05.01]. Singurul exemplu de heterociclu de azot spiro-fuzionat din seria *ent*-kauranică a fost raportat recent şi reprezintă o pirazolină (6) cu proprietăţi antiinflamatoare foarte slabe şi care nu posedă citotoxicitate [Hueso-Falcón I. et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of ent-kaurene derivatives. European Journal of Medicinal Chemistry, 2011, 46(4), pp.1291-1305].

Sunt cunoscuţi derivaţi citotoxici ai *ent*-kauranilor naturali cu structură mai complexă, la care scheletul carbonic conţine mai multe grupe funcţionale oxigenate. Într-un brevet recent au fost raportaţi o serie de derivaţi ai glaucocalixinei (7), în care legătura dublă exometilenică a fost supusă reacţiei de hidroaminare formând derivaţi cu azot, inclusiv cu heterocicli ca 2-pirolidona [8]. Pentru unul din compuşii revendicaţi au fost prezentate datele citotoxicităţii *in vitro* care demonstrează o activitate moderată faţă de celulele MDA-MB-231 (cancer mamar). Lipsa datelor citotoxicităţii compuşilor revendicaţi faţă de un spectru mai larg de celule tumorale reprezintă dezavantajul clar al acestei invenţii. De asemenea, disponibilitatea redusă a compusului natural (7), care a fost identificat în câteva plante din flora spontană a Asiei de Sud-Est este la fel un impediment serios în aplicarea derivaţilor citotoxici ai glaucocalixinei.

Cele mai recente exemple de derivaţi citotoxici *ent*-kauranici de origine naturală se atribuie la compusul de origine naturală flexicaulina A (8) [9]. S-a dovedit că acest compus posedă citotoxicitate împotriva celulelor carcinomului de colon într-un mod selectiv, arătând o toxicitate minimă la animale. S-a raportat sinteza Pseudoirroratinei A (9), care este de asemenea un compus natural, de rând cu citotoxicitatea sa împotriva unui şir de linii celulare canceroase [10], [11]. Diferiţi derivaţi ai compusului (8) au fost raportaţi într-un brevet recent [12]. Dezavantajele acestei invenţii constau în faptul că, precursorul natural (8) reprezintă un compus *ent*-kauranic de o complexitate înaltă, datorată multiplelor grupe funcţionale şi este greu disponibil, deoarece se extrage din flora spontană din sud-vestul regiunii Sichuan (China). Totodată, conţinutul acestuia este foarte mic - de cca. 0,07% din masa plantelor uscate. De asemenea, nu a fost demonstrat indicele de selectivitate al compuşilor înrudiţi cu flexicaulina A (8) dezvăluiţi în [12]. Niciunul dintre compuşii raportaţi [9-12] nu conţine grupe funcţionale spiro-γ-lactamice.

Problema abordată de invenţia dată este legată de identificarea derivaţilor acidului *ent*-kaurenoic ce conţin grupe funcţionale heteroatomice şi care au activitate citotoxică selectivă împotriva liniilor celulare tumorale maligne.

Soluţia pentru această problemă este oferită de doi noi derivaţi *ent*-kauranici (10) şi (11), care includ un heterociclu spiro-γ-lactamic adiţional ataşat la scheletul carbonic diterpenic şi datorită acestei grupe funcţionale posedă citotoxicitate faţă de celulele tumorale maligne.

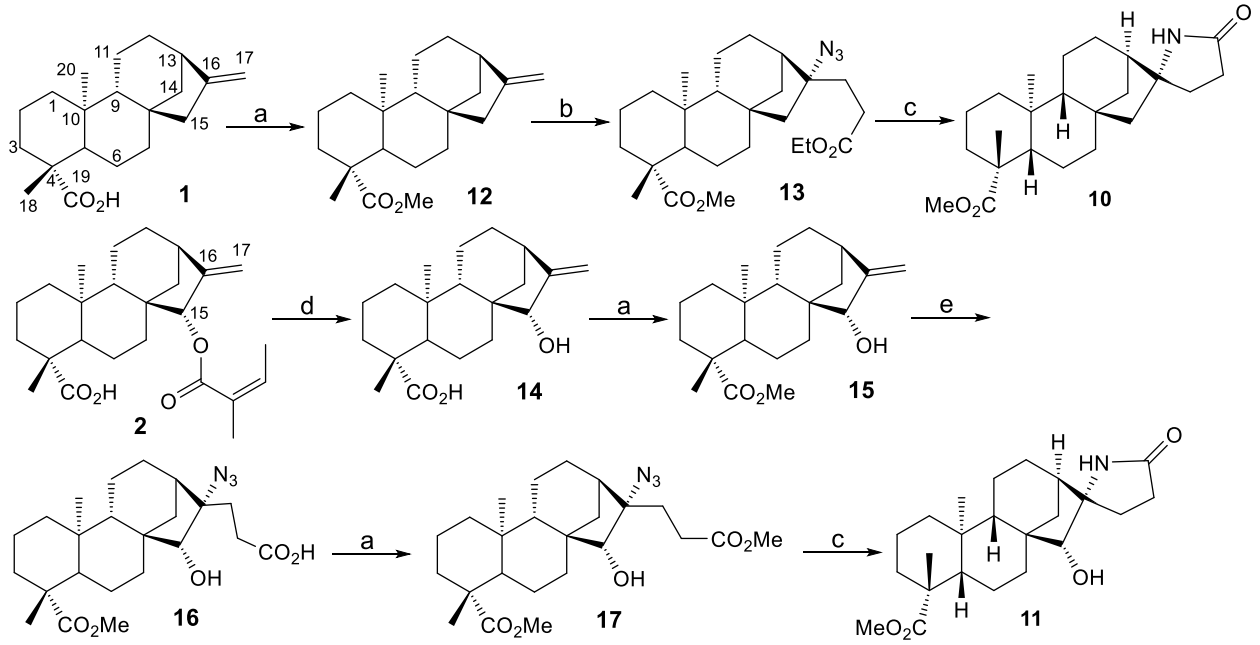
Rezultatul invenţiei include sinteza chimică a compuşilor spiro-γ-lactamici (10) şi (11) cu schelet al ent-kauranului care au demonstrat o activitate citotoxică selectivă faţă de celulele tumorale Capan-1 (adenocarcinom pancreatic), Hap-1 (leucemie mieloidă cronică), HCT-116 (carcinom colorectal), NCI-H460 (carcinom pulmonar) la concentraţii micromolare şi submicromolare.

Avantajele compuşilor obţinuţi reprezintă în primul rând structura lor chimică bazată pe precursori naturali funcţionalizaţi în mod biomimetic cu grupa funcţională spiro-γ-lactamică, procedura sintetică relativ simplă cu un număr mic de etape, disponibilitatea largă a materiei prime din surse vegetale regenerabile cultivate industrial. Avantajul cel mai relevant este activitatea citotoxică şi un indice de selectivitate ridicat faţă de mai multe linii de celule tumorale.

Compuşii propuşi au scheletul carbonic ent-kauranic extins cu o grupă spiro-γ-lactamică, introdusă selectiv la atomul de carbon C-16. Lactama (10) nu are grupe funcţionale heteroatomice la C-15, în timp ce lactama (11) conţine grupa hidroxil la C-15. Generarea unităţii heterociclice poate fi realizată prin diferite metode sintetice, cel mai convenabil printr-o secvenţă în două etape, pornind de la acidul *ent*-kaurenoic (1) pentru obţinerea lactamei (10) sau de la acidul *ent*-15-angeloiloxi-16-kaurenoic (2) pentru obţinerea lactamei (11). Etapa cheie a acestei secvenţe este o reacţie de carboazidare mediată de radicali liberi, urmată de hidrogenarea şi lactamizarea simultană.

Investigarea profilului de activitate biologică a ambelor lactame (10) şi (11) a arătat citotoxicitate relevantă împotriva mai multor linii celulare tumorale şi o citotoxicitate mult mai mică faţă de celulele retinei normale (hTERT RPE-1). Valorile calculate ale indicelui de selectivitate (SI), care este dat de raportul IC_{50} pentru celulele normale/IC_{50} pentru celulele tumorale corespunzătoare [6], sunt mai mari decât valoarea pragului de 3.

Materia primă pentru obţinerea compuşilor (10) şi (11) a fost reziduul după recoltare a florii-soarelui, din care au fost extraşi acizii *ent*-kaurenoic (1) şi *ent*-15-angeloyloxi-16-kaurenoic (2) [Morarescu O., Grinco M., Dragalin I., Kulciţki V., Ungur N. Study on extraction process of sunflower (*Helianthus Annuus* L.) dry wastes using different solvents. Chem. J. Moldova, 2013, 8, 90-93; Grinco M., Chetraru O., Kulciţki V., Barba A., Boico A., Vlad P. F., Ungur N. C15 functionalized derivatives of *ent*-kaur-16-en-19-oic acid: isolation from the sunflower Helianthus annuus L. and synthesis. Chem. J. Moldova, 2010, 5, p. 106 – 108]. Transformările sintetice care conduc la lactamele (10) şi (11) sunt prezentate în schemă.



Schemă. Reagenţi şi condiţii: a) CH_2N_2, Et_2O, 0.5 ore; (b) ICH_2CO_2Et, $PhSO_2N_3$, Et_3B, EtOH, t.c., O_2, 2 ore; (c) 1 atm. H_2, 10% Pd/C, EtOAc, t.c., 48 ore; (d) KOH, EtOH, reflux, 3 ore; (e) ICH_2CO_2H, $PhSO_2N_3$, Bu_6Sn_2, DTBHN, C_6H_6, 95 °C, 5 ore.

Metilarea acidului (1) cu o soluţie eterică de diazometan a condus la esterul (12). Carboazidarea esterului (12) până la azidă (13) a fost realizată cu iodoacetatul de etil în prezenţa unui exces mic de fenilsulfonilazidă ca sursă de azidă. Hidroliza alcalină a esterului (2) a condus la obţinerea acidului (14), care a fost metilat cu diazometan, obţinându-se esterul (15). Datorită impedimentelor sterice, carboazidarea esterului (15) a fost realizată cu un randament mai bun, utilizând acidul iodoacetic ca agent de alchilare. Pentru iniţierea radicalică a ambelor procedee, s-au utilizat hexabutil stanatul cu terţbutilhiponitrit sau trietilboranul, obţinându-se rezultate similare. Acidul carboxilic (16), rezultat din esterul (15), după reacţia de carboazidare a fost metilat cu diazometan, obţinându-se azida (17). Etapa finală de reducere a fost realizată cu ambele substraturi (13) şi (17) la hidrogenare mediată de paladiu pe cărbune. Lactamele individuale (10) şi (11) au fost izolate şi purificate prin cromatografie pe coloană cu silicagel. Structura ambelor lactame (10) şi (11) a fost demonstrată fără echivoc pe baza datelor spectrale (RMN, IR, MS). Spectrele IR şi RMN a lactamelor (10) şi (11) sunt prezentate în figurile 1-6. Stereochimia absolută la centrul chiral C-16 nou format a fost confirmată prin analiza cu raze X a unui monocristal a compusului (10) (fig. 7).

Evaluarea activităţii citotoxice a lactamelor (10) şi (11) a fost realizată pe o serie de celule tumorale, iar rezultatele sunt prezentate în tabel. Docetaxelul şi staurosporina au fost utilizate ca martori pozitivi care asigură validarea experimentului conform protocolului standard de testări.

Tabel

Activitatea antiproliferativă a lactamelor (10) şi (11)

Compusul	Conc. unit	IC_{50}								
		hTERT RPE-1	Capan-1	Hap-1	HCT-116	NCI-H460	DND-41	HL-60	K-562	Z-138
10	µM	7,6±0,5	1,2±0,7	2,1±0,4	0,8±0,2 SI=9,5	1,4±0,1	21,4±10,1	38,3±17,8	36,4±11,5	52,0±33,4
11	µM	27,7±4,3	3,7±1,7 SI=7,5	1,1±0,6 SI=25,2	4,0±3,7	1,9±0,2	8,3±2,0	38,0±11,8	56,5±2,8	39,8±10,9
DT	nM	18,7±4,8	4,2±1,8	4,5±1,5	2,2±0,8	5,5±1,3	4,7±1,2	4,3±1,6	5,2±1,2	3,7±0,7
SP	nM	1,0	6,2±1,8	1,3±0,2	1,5	2,2±0,8	8,6±1,5	9,1±1,6	27,9±3,2	6,7±4,4

SI – indicele de selectivitate; DT – Docetaxel; SP – Staurosporina.

Nivelurile de activitate ale compuşilor (10) şi (11) sunt mult mai mari decât ale medicamentului de referinţă Cisplatin (IC_{50} 16,5 pentru HCT-116 şi 5,33 pentru NCI-H460) şi comparabile cu medicamentul comercializat în prezent Midostaurina (IC_{50} 0,237 pentru HCT- 116 şi 0,43 pentru NCI-H460, date disponibile ale institutului Sanger: https://www.cancerrxgene.org).

Acţiunea selectivă a lactamelor (10) şi (11) a fost demonstrată prin teste *in vitro* care au fost efectuate pe celule de retină necanceroase (hTERT RPE-1), iar rezultatele IC_{50} au arătat valori mai mari decât pentru celulele tumorale selectate. Indicii de selectivitate (SI) sunt daţi de raportul IC_{50} pentru celulele normale/IC_{50} pentru celulele tumorale corespunzătoare [6]. Valorile calculate sunt prezentate în tabel. Lactamele (10) şi (11) sunt compuşi stabili în aer şi la umiditate, solubili în DMSO şi în alţi solvenţi organici.

Lista figurilor

Figurile prezentate mai jos sunt date pentru a demonstra structura atribuită a compuşilor propuşi, care sunt noi entităţi chimice:

- fig. 1, spectrul IR al lactamei (10);
- fig. 2, spectrul ^{1}H RMN al lactamei (10);
- fig. 3, spectrul ^{13}C RMN al lactamei (10);
- fig. 4, spectrul IR al lactamei (11);
- fig. 5, spectrul ^{1}H RMN al lactamei (11);
- fig. 6, spectrul ^{13}C RMN al lactamei (11);
- fig. 7, structura moleculară a lactamei (10) realizată în baza analizei cu raze X.

Exemple de realizare a invenţiei

Sinteza lactamei (10)

O soluţie de Et_3B (1 M în THF, 0,47 ml) s-a adăugat cu seringa în două porţiuni, la amestecul de iodoacetat de etil (39 µL, 0,33 mmol), *ent*-kaurenoat de metil (12) (50 mg, 0,16 mmol) şi $PhSO_2N_3$ (87 mg, 0,47 mmol) în EtOH (2 ml, important: acul seringii trebuie scufundat în amestecul de reacţie pentru a evita contactul direct al picăturilor de Et_3B cu aerul). Amestecul de reacţie este agitat la temperatura camerei timp de 2 ore (control CSS). Prelucrarea reacţiei include diluarea cu soluţuie apoasă de NaCl (5 ml) şi extracţia cu Et_2O (2 x 15 ml). Fazele organice combinate se usucă pe Na_2SO_4, se filtrează şi se evaporă solventul sub presiune redusă. Produsul brut se purifică prin cromatografie pe coloană (hexan/EtOAc) obţinându-se azida (13) (43 mg, 60%). Lichid vâscos incolor. $[a]_D^{20}$= - 79.50 (c=0.84, $CHCl_3$). IR (ν, cm^{-1}): 2944, 2873, 2096, 1727, 1502. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 4.12 (*q*, *J* = 7.2 Hz, -$CO_2\underline{CH_2}CH_3$), 3.62 (*s*, -CO_2CH_3), 2.42 (*t*, *J* = 7.9 Hz, -$\underline{CH_2}$-COOEt), 1.25 (*t*, *J* = 7.2 Hz, -$CO_2CH_2\underline{CH_3}$), 1.14 (*s*, CH_3-20), 0.80 (*s*, CH_3-22). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 177.90 (*s*, C-21), 173.38 (*s*, C-19), 73.07 (*s*, C-16), 60.54 (*t*, -$CO_2\underline{CH_2}CH_3$), 56.72 (*d*, C-5), 55.80 (*d*, C-9), 51.51 (*t*, C-15), 51.13 (*q*, -CO_2CH_3), 44.67 (*s*, C-4), 44.31 (*d*, C-13), 43.74 (*s*, C-8), 41.44 (*t*, C-7), 40.59 (*t*, C-1), 39.41 (*s*, C-10), 37.99 (*t*, C-14), 37.70 (*t*, C-3), 30.30 (*t*, C-17), 29.73 (*t*, C-18), 28.66 (*q*, C-20), 26.13 (*t*, C-12), 21.96 (*t*, C-6), 19.00 (*t*, C-2), 18.47 (*t*, C-11), 15.26 (*q*, C-19), 14.19 (*q*, -$CO_2CH_2\underline{CH_3}$). GCMS m/z calculat pentru [$C_{25}H_{39}N_3O_4$]: 445.28; găsit: 402.3 (M-HN_3).

O soluţie de azidă (13) (53 mg, 0,12 mmol) şi 10% Pd / C (10% m/m) în EtOAc absolut (2 ml) a fost agitată timp de 48 de ore la temperatura camerei în atmosferă de H_2 (1 atm). Catalizatorul a fost filtrat, solventul a fost evaporat la presiune redusă şi produsul brut a fost purificat prin cromatografie pe coloană (CH_2Cl_2/MeOH 90:10), obţinându-se lactama (10) (42 mg, 95%) în formă de pulbere albă. P.t. 150-152 °C, $[a]_D^{20}$= -77.37 (*c* 4.50, $CHCl_3$). IR (ν, cm^{-1}): 3676, 3209, 2937, 2298, 1712, 1683. ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 6.68 (*s*, -NH), 3.63 (*s*, -CO_2CH_3), 2.30 (*m*, CH_2-17), 2.05 (*d*, *J* = 11.9 Hz, CH_2-18), 1.15 (*s*, CH_3-20), 0.81 (*s*, CH_3-22). ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 177.91, 176.79, 67.23, 57.62, 56.90, 55.64, 51.09, 46.56, 44.89, 43.80, 41.85, 40.72, 39.43, 38.88, 38.09, 31.15, 29.99, 28.68, 27.09, 22.05, 19.08, 18.84, 15.45.

Sinteza lactamei (11)

DTBHN (1.0 mg, 0,006 mmol) a fost adăugat la o soluţie de acid iodoacetic (71,4 mg, 0,38 mmol), $PhSO_2N_3$ (105,0 mg, 0,57 mmoli), Bu_6Sn_2 (145 µL, 0,28 mmol) şi 15-hidroxi-*ent*-kaurenoat de metil (15) (64,0 mg, 0,192 mmol) în C_6H_6 absolut (2,0 ml) în atmosferă inertă. Amestecul de reacţie a fost refluxat timp de 5 ore (control CSS). Produsul brut a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (eter de petrol/EtOAc 70:30) obţinându-se azida (16) sub formă de ulei incolor (91 mg, contaminat cu $PhSO_2N_3$). IR (ν, cm^{-1}): 3675, 2988, 2955, 2928, 2902, 2108, 1724, 1553. ^{1}H RMN (400 MHz, D_3COD), δ_H: 3.63 (*s*, -CO_2CH_3), 3.52 (*s*, CH-15), 2.46 (*t*, CH_2-17), 1.17 (*s*, CH_3-20), 0.84 (*s*, CH_3-22). ^{13}C RMN (100 MHz, D_3COD) δ_C: 179.64 (2xC(O)2), 88.34, 76.00, 58.07, 56.29, 51.64, 48.51, 44.99, 42.97, 41.77, 40.84, 39.09, 37.14, 36.66, 29.14, 29.04, 28.05, 26.72, 22.29, 20.12, 19.59, 16.00.

La o soluţie de azidă (16) (45 mg, 0,10 mmol) în aproximativ 5 ml Et_2O la temperatura de 0ºC s-a adăugat prin picurare o soluţie eterică de CH_2N_2 până când culoarea galbenă a persistat (0,2-0,25 mmol). Amestecul a fost agitat timp de 30 min şi concentrat cu obţinerea produsului brut care a fost purificat prin cromatografie pe coloană (pentan/EtOAc 95:5) şi a dat azida (17) (41 mg, 99%) sub formă de ulei incolor. $[a]_D^{20}$= - 55.81 (*c* 2.13, $CHCl_3$). IR (ν, cm^{-1}): 3737, 3526 (w), 2940, 2872, 2853, 2299, 2107, 1725, 1445. ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 3.69 (*s*, C-19 (-CO_2CH_3)), 3.63 C-21 (*s*, -CO_2CH_3)), 3.40 (*s*, CH-15), 2.56 (*t*, *J*= 7.9 Hz, CH_2-18), 1.16 (*s*, CH_3-20), 0.81 (*s*, CH_3-22). ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 177.84 (*s*, C-21), 173.61 (*s*, C-19), 85.22 (*d*, C-15), 75.44 (*d*, C-16), 56.71 (*d*, C-5), 54.72 (*d*, C-9), 51.71 (*q*, C-21(-CO_2CH_3)), 51.06 (*q*, C-19(-CO_2CH_3)), 47.55 (*s*, C-8), 43.78 (*s*, C-4), 41.87 (*d*, C-13), 40.59 (*t*, C-1), 39.59 (*s*, C-10), 37.98 (*t*, C-12), 36.05 (*t*, C-7), 35.66 (*t*, C-3), 29.41 (*t*, C-17), 28.63 (*q*, C-20),

28.41 (*t*, C-18), 25.78 (*t*, C-14), 21.03 (*t*, C-6), 18.99 (*t*, C-2), 18.19 (*t*, C-11), 15.34 (*q*, C-22). GCMS m/z calculat pentru $C_{25}H_{39}N_3O_4$: 445.28; găsit: 402.3 (M^+-HN_3).
O soluţie de azidă (17) (53 mg, 0,12 mmol) şi 10% Pd/C (10% m/m) în EtOAc absolut (2 ml) a fost agitată timp de 64 de ore la temperatura camerei în atmosferă de H_2 (1 atm). Catalizatorul a fost filtrat, solventul a fost evaporat la presiune redusă şi produsul brut a fost purificat prin cromatografie pe coloană (CH_2Cl_2/MeOH 85:15), obţinându-se lactama (11) (16 mg, 35%), lichid vâscos. $[\alpha]_D^{25}$ = - 90.85 (c 3.0, $CHCl_3$). IR (ν, cm^{-1}): 3351, 2933, 2871, 2322, 1722, 1685, 1552. ^{1}H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 6.73 (*s*, NH), 3.63 (*s*, $-CO_2CH_3$), 3.49 (*s*, CH-15), 1.16 (*s*, CH_3-20), 0.81 (*s*, CH_3-22). ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 179.09 (*s*, C-19), 178.04 (*s*, C-21), 88.17 (*d*, C-15), 70.82 (*s*, C-16), 56.80 (*d*, C-5), 54.39 (*d*, C-9), 51.14 (*q*, $-CO_2CH_3$), 47.42 (*s*, C-8), 44.91 (*d*, C-13), 43.75 (*s*, C-4), 40.67 (*t*, C-1), 38.01 (*t*, C-3), 39.61 (*s*, C-10), 36.63 (*t*, C-7), 35.44 (*t*, C-12), 30.57 (*t*, C-17), 29.32 (*t*, C-18), 28.64 (*q*, C-20), 26.34 (*t*, C-14), 21.16 (*t*, C-6), 19.04 (*t*, C-2), 19.02 (*t*, C-11), 15.55 (*q*, C-22). Analiza elementală pentru $C_{23}H_{35}NO_4$ (389.26): C, 70.92; H, 9.06; N, 3.60; O, 16.43; găsit C, 70.80; H, 9.15; N, 3.70; O, 16.35.

Testele de citotoxicitate in vitro
Tulpinile celulare HL-60, K-562, Z-138, Capan-1, HCT-116, NCI-H460 au fost achiziţionate de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, SUA), cu exceptia tulpinelor DND-41, care au fost procurate de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ Leibniz-Institut, Germania). Toate tulpinile celulare au fost menţinute 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). Compuşii de referinţă citotoxici staurosporina şi docetaxelul au fost obţinuţi de la Selleckchem (Munich, Germania). Toate soluţiile stock au fost preparate în DMSO.
Citotoxicitatea compuşilor revendicaţi (10) şi (11) a fost determinată conform metodei de imagistică în timp real pe microplanşe cu 384 godeuri cu pereţi negri şi fundul transparent (Greiner) în analize repetitive duble. Tupinile celulare aderente, Capan-1, HCT-116 şi NCI-H460 au fost însămânţate la o densitate între 500 şi 1500 celule per godeu, iar tulpinile suspendate DND-41, HL-60, K-562 şi Z-138 au fost însămânţate la o densitate între 2500 şi 5500 celule per godeu. După incubarea pe durata nopţii, tulpinile celulare au fost tratate cu compuşii testaţi în concentraţii diferite, pornind de la 100 la 6,4 x 10^{-3} μM. Microplanşele au fost incubate la 37°C şi monitorizate 72 ore într-un dispozitiv IncuCyte® (Essen BioScience Inc., Ann Arbor, MI) pentru imagistică în timp real. În calitate de standard de referinţă cu activitate citotoxică cunoscută au fost utilizaţi docetaxelul şi staurosporina. Imaginile au fost înregistrate în proiecţii singulare la fiecare trei ore cu o amplificare optică de 10 ori. Multiplicarea celulelor a fost cuantificată în baza procentului de confluenţă celulară după cum a fost analizat de dispozitivul IncuCyte®. Valorile IC_{50} au fost determinate în baza valorilor AUC. Estimarea indicelui de selectivitate a fost bazată pe citotoxicitatea demonstrată faţă de celulele normale de retină umană hTERT RPE-1. Valorile medii ale IC_{50} sunt prezentate în tabel.