



MD 4786 C1 2022.08.31

## REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4786** (13) **C1**  
(51) Int.Cl: *C07D 209/96* (2006.01)  
*C07C 61/08* (2006.01)  
*A61K 31/015* (2006.01)  
*A61K 31/403* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

## (12) BREVET DE INVENȚIE

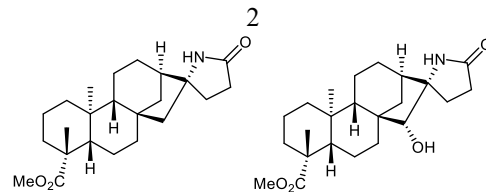
<p>(21) Nr. depozit: a 2020 0026 (22) Data depozit: 2020.04.06</p> <p>(41) Data publicării cererii: 2021.10.31, BOPI nr. 10/2021</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2022.01.31, BOPI nr. 1/2022</p>
<p>(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE CHIMIE AL MEC, MD; KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN, BE; UNIVERSITÄT BERN, CH</p> <p>(72) Inventatori: KULCIŢKI Veaceslav, MD; GÎRBU Vladilena, MD; PRUTEANU Elena, MD; RENAUD Philippe, CH; DAELEMANS Dirk, BE; UNGUR Nikon, MD</p> <p>(73) Titulari: INSTITUTUL DE CHIMIE AL MEC, MD; KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN, BE; UNIVERSITÄT BERN, CH</p> <p>(74) Mandatar autorizat: JOVMIR Tudor</p>	

(54) Noi spiro- $\gamma$ -lactame, derivate ale acidului *ent*-kaurenoic, cu activitate citotoxică selectivă

(57) Rezumat:

Invenția se referă la chimia compușilor naturali și chimia medicinală, în special la derivați ai acidului *ent*-kaurenoic ce conțin o grupă funcțională spiro- $\gamma$ -lactamică, care prezintă proprietăți citotoxice selective față de celulele canceroase umane și pot fi utilizați ca agenți chimioterapeutici pentru tratamentul afecțiunilor oncologice.

Conform invenției, se revendică doi derivați ai acidului *ent*-kaurenoic cu următoarele formule de structură:



Compușii revendicați posedă activitate citotoxică selectivă împotriva liniilor de celule tumorale Capan-1 (adenocarcinom pancreatic), Hap-1 (leucemie mieloidă cronică), HCT-116 (carcinom colorectal) și NCI-H460 (carcinom pulmonar).

Revendicări: 3

Figuri: 7

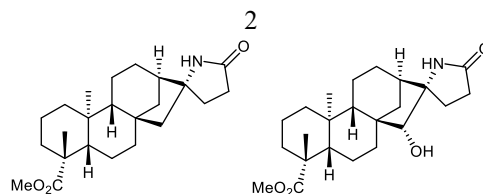
MD 4786 C1 2022.08.31

**(54) New spiro- $\gamma$ -lactams, *ent*-kaurenoic acid derivatives, with selective cytotoxic activity**

**(57) Abstract:**

The invention relates to the natural compound chemistry and medicinal chemistry, in particular to *ent*-kaurenoic acid derivatives containing a spiro- $\gamma$ -lactam functional group, which exhibit selective cytotoxic properties in relation to human cancer cells and can be used as chemotherapeutic agents for the treatment of oncological diseases.

According to the invention, claimed are two *ent*-kaurenoic acid derivatives with the following structural formulas:



The claimed compounds have selective cytotoxic activity against the Capan-1 (pancreatic adenocarcinoma), Hap-1 (chronic myeloid leukemia), HCT-116 (colorectal carcinoma), NCI-H460 (pulmonary carcinoma) tumor cell lines.

Claims: 3

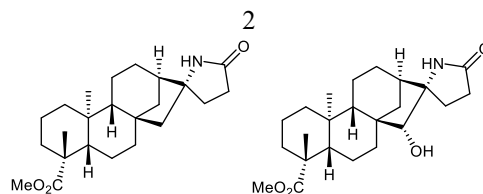
Fig.: 7

**(54) Новые спиро- $\gamma$ -лактамы, производные *энт*-кауреновой кислоты, с селективной цитотоксической активностью**

**(57) Реферат:**

Изобретение относится к химии природных соединений и медицинской химии, в частности к производным *энт*-кауреновой кислоты содержащим спиро- $\gamma$ -лактамную функциональную группу, которые представляют селективные цитотоксические свойства по отношению к раковым клеткам человека и могут быть использованы в качестве химиотерапевтических агентов для лечения онкологических заболеваний.

Согласно изобретению, заявлены два производных *энт*-кауреновой кислоты с следующими структурными формулами:



Заявленные соединения обладают селективной цитотоксической активностью против линии раковых клеток Capan-1 (панкреатическая аденокарцинома), Hap-1 (хроническая миелоидная лейкемия), HCT-116 (колоректальная карцинома) и NCI-H460 (карцинома лёгких).

П. формулы: 3

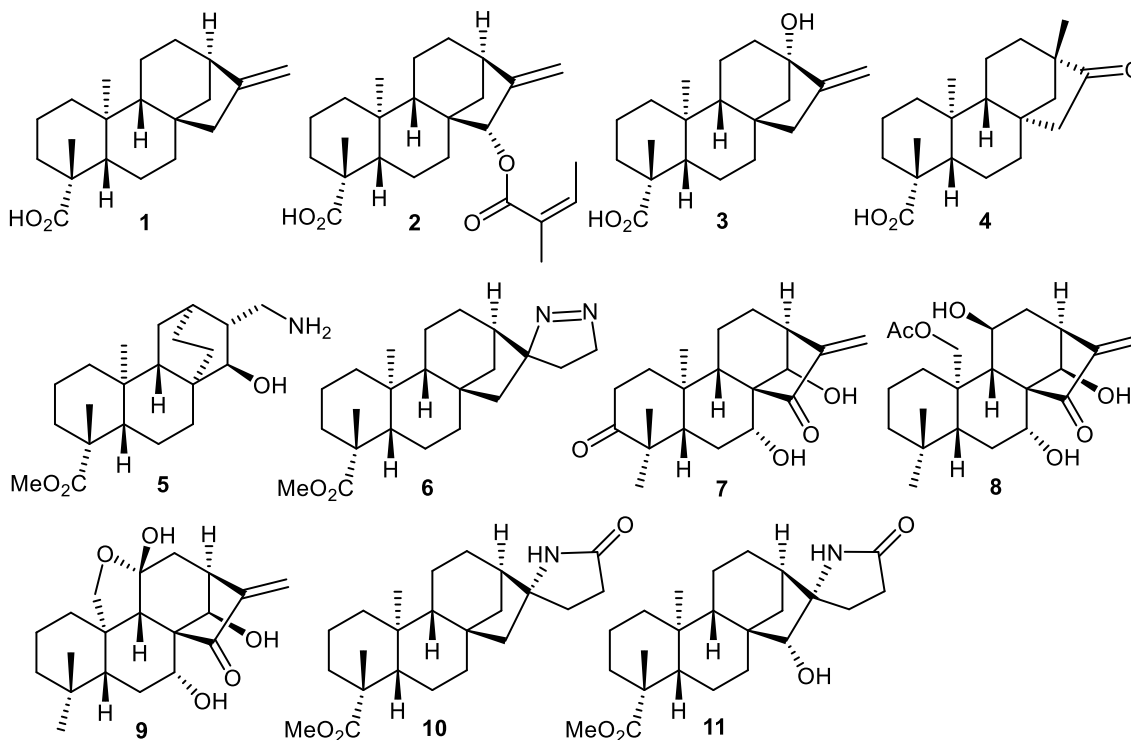
Фиг.: 7

**Descriere:****(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)**

5 Invenția se referă la chimia compușilor naturali și chimia medicinală, în special la sinteza și  
utilizarea în calitate de agenți chimioterapeutici pentru tratarea maladiilor canceroase a derivaților ce  
includ o grupă funcțională spiro  $\gamma$ -lactamică suplimentară la scheletul carbonic diterpenic extins al  
acidului *ent*-kaurenoic (**1**) – un component al extractului din deșeurile de floarea-soarelui (*Helianthus*  
*annuus*).

10 Lactamele reprezintă o clasă de compuși chimici care și-au găsit aplicații largi în elaborarea  
medicamentelor. Cel mai explorat exemplu este fragmentul  $\beta$ -lactamic, care reprezintă un reper al  
antibioticelor moderne. Pe lângă aceasta, alte lactame sunt foarte relevante din acest punct de vedere. În  
particular,  $\gamma$ -lactamele sunt farmacofori importanți și multe medicamente conțin această grupă funcțională  
15 [Caruano J., Muccioli G. G., Robiette R. Biologically active  $\gamma$ -lactams: synthesis and natural sources.  
Organic & Biomolecular Chemistry, 2016, 14(43), 10134-10156]. Unitatea heterociclică  $\gamma$ -lactamică  
poate fi integrată în structura medicamentului concret în diferite moduri: fie în formă condensată, spiro  
sau izolată. Lactamele condensate și izolate sunt destul de răspândite, atât în medicamente cunoscute, cât  
și în alți compuși sintetici de interes biologic relevant. Pe de altă parte,  $\gamma$ -lactamele spiro-fuzionate sunt  
foarte rare, iar potențialul lor este slab explorat [Saldívar-González F.I., Lenci E., Trabocchi A. and  
20 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 unității  $\gamma$ -  
lactam spiro-fuzionate în cadrul compușilor naturali accesibili reprezintă o cale convenabilă către noi  
entități chimice cu activitate biologică promițătoare. În particular, utilizarea diterpenoidelor *ent*-kauranice  
în calitate de structuri disponibile pentru sinteza conjugatelor hibride terpenic-heterociclice este  
convenabilă în mod deosebit. Țesutul vegetal de floarea-soarelui (*Helianthus Annuus*), ce reprezintă în  
25 prezent deșeuri după recoltare, conține o cantitate mare de acid *ent*-kaurenoic (**1**) și *ent*-15-angeloyloxi-  
16-kaurenoic (**2**), care pot fi obținuți în cantități preparative [Morarescu O., Grinco M., Dragalin I.,  
Kulcički 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., Kulcički V., Barba A.,  
Boico A., Vlad P. F., Ungur N. C15 functionalized derivatives of *ent*-kaur-16-en-19-oic acid: isolation  
30 from the sunflower *Helianthus annuus* L. and synthesis. Chem. J. Moldova, 2010, 5, p. 106 – 108].

Exemplele recente ale altor compuși *ent*-kauranici ce posedă diferite proprietăți terapeutice au fost  
descrise în mai multe publicații. Derivații citotoxici ai steviolului (**3**) au fost descriși de Ukiya et al. [1].  
Modificarea compusului natural a fost efectuată prin reducerea fragmentului carboxilic, urmată de  
derivatizarea alcoolului primar rezultat cu diferiți agenți de acilare. Derivații O-acilați au prezentat  
35 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<sub>50</sub> cu o  
singură cifră. Un dezavantaj evident al acestor derivați 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 așa-numitul  
40 izo-steviol (**4**). Spre deosebire de alcoolul (**3**), compusul regrupat (**4**) a fost subiectul unor intense  
modificări chimice care a condus la obținerea mai multor substanțe cu proprietăți terapeutice relevante,  
inclusiv apoptotice [2], citotoxice [3], [4] și antiproliferative [5]. Puține date sunt însă disponibile cu  
privire la factorul de selectivitate [6] al acestor derivați raportați.



Transformările chimice ale acidului ent-kaurenoic (**1**) s-au efectuat în două direcții: modificarea grupului carboxilic din ciclul A și funcționalizarea legăturii duble cu substituenți oxigenați [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 puține date despre introducerea atomului de azot în scheletul carbonic al compusului (**1**). Grupele funcționale heteroatomice cu azot sunt farmacofori relevanți în diterpenoidele biologic active și exemple similare pot fi găsite în o serie de brevete. De exemplu, o amină diterpenică (**5**) de structură atisanică a fost menționată 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 și reprezintă o pirazolină (**6**) cu proprietăți antiinflamatoare foarte slabe și 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 cunoscuți derivați citotoxici ai *ent*-kauranilor naturali cu structură mai complexă, la care scheletul carbonic conține mai multe grupe funcționale oxigenate. Într-un brevet recent au fost raportați o serie de derivați ai glaucocalixinei (**7**), în care legătura dublă exometilenică a fost supusă reacției de hidroaminare formând derivați cu azot, inclusiv cu heterocicli ca 2-pirolidona [8]. Pentru unul din compușii revendicați au fost prezentate datele citotoxicității *in vitro* care demonstrează o activitate moderată față de celulele MDA-MB-231 (cancer mamar). Lipsa datelor citotoxicității compușilor revendicați față de un spectru mai larg de celule tumorale reprezintă dezavantajul clar al acestei invenții. 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 derivaților citotoxici ai glaucocalixinei.

Cele mai recente exemple de derivați 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 șir de linii celulare canceroase [10], [11]. Diferiți derivați ai compusului (**8**) au fost raportați într-un brevet recent [12]. Dezavantajele acestei invenții constau în faptul că, precursorul natural (**8**) reprezintă un compus *ent*-kauranic de o complexitate înaltă, datorată multiplelor grupe funcționale și este greu disponibil, deoarece se extrage din flora spontană din sud-vestul regiunii Sichuan (China). Totodată, conținutul acestuia este foarte mic - de cca. 0,07% din masa plantelor uscate. De asemenea, nu a fost demonstrat indicele de selectivitate al compușilor înrudiți cu flexicaulina A (**8**)

dezvăluți în [12]. Niciunul dintre compușii raportați [9-12] nu conține grupe funcționale spiro- $\gamma$ -lactamice.

Problema abordată de invenția dată este legată de identificarea derivaților acidului *ent*-kaurenoic ce conțin grupe funcționale heteroatomice și care au activitate citotoxică selectivă împotriva liniilor celulare tumorale maligne.

Soluția pentru această problemă este oferită de doi noi derivați *ent*-kauranici (**10**) și (**11**), care includ un heterociclu spiro- $\gamma$ -lactamic adițional atașat la scheletul carbonic diterpenic și datorită acestei grupe funcționale posedă citotoxicitate față de celulele tumorale maligne.

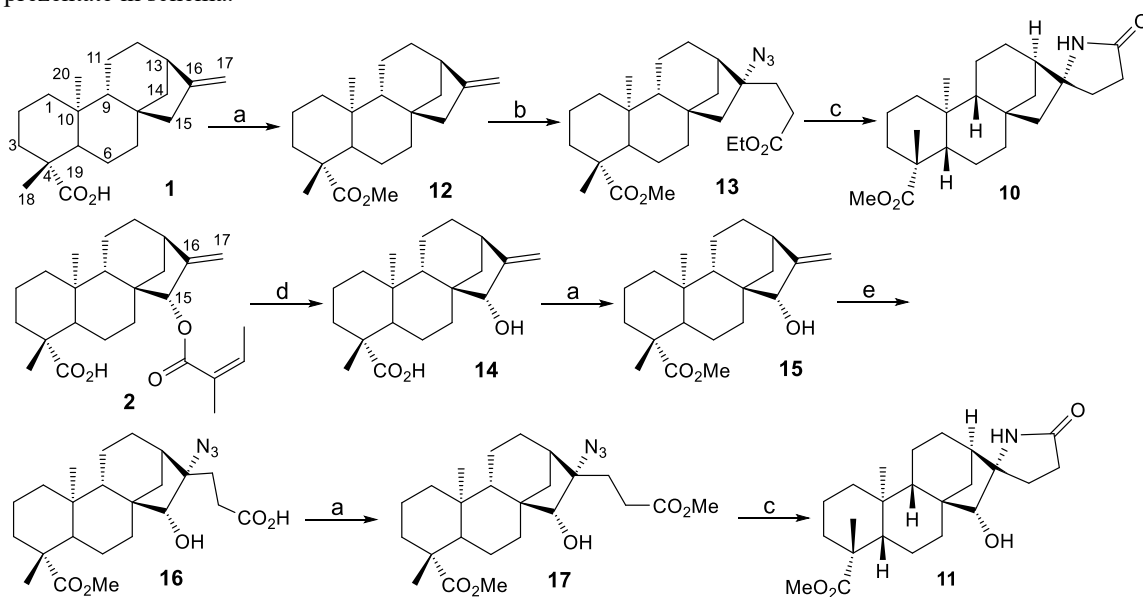
Rezultatul invenției include sinteza chimică a compușilor spiro- $\gamma$ -lactamici (**10**) și (**11**) cu schelet al *ent*-kauranului care au demonstrat o activitate citotoxică selectivă față de celulele tumorale Capan-1 (adenocarcinom pancreatic), Hap-1 (leucemie mieloidă cronică), HCT-116 (carcinom colorectal), NCI-H460 (carcinom pulmonar) la concentrații micromolare și submicromolare.

Avantajele compușilor obținuți reprezintă în primul rând structura lor chimică bazată pe precursori naturali funcționalizați în mod biomimetic cu grupa funcțională spiro- $\gamma$ -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 și un indice de selectivitate ridicat față de mai multe linii de celule tumorale.

Compușii propuși au scheletul carbonic *ent*-kauranic extins cu o grupă spiro- $\gamma$ -lactamică, introdusă selectiv la atomul de carbon C-16. Lactama (**10**) nu are grupe funcționale heteroatomice la C-15, în timp ce lactama (**11**) conține grupa hidroxil la C-15. Generarea unității heterociclice poate fi realizată prin diferite metode sintetice, cel mai convenabil printr-o secvență în două etape, pornind de la acidul *ent*-kaurenoic (**1**) pentru obținerea lactamei (**10**) sau de la acidul *ent*-15-angeloyloxi-16-kaurenoic (**2**) pentru obținerea lactamei (**11**). Etapa cheie a acestei secvențe este o reacție de carboxidare mediată de radicali liberi, urmată de hidrogenarea și lactamizarea simultană.

Investigarea profilului de activitate biologică a ambelor lactame (**10**) și (**11**) a arătat citotoxicitate relevantă împotriva mai multor linii celulare tumorale și o citotoxicitate mult mai mică față 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 obținerea compușilor (**10**) și (**11**) a fost reziduul după recoltare a florii-soarelui, din care au fost extrași acizii *ent*-kaurenoic (**1**) și *ent*-15-angeloyloxi-16-kaurenoic (**2**) [Morarescu O., Grinco M., Dragalin I., Kulcički 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., Kulcički 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**) și (**11**) sunt prezentate în schemă.



**Schemă.** Reagenți și condiții: 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<sub>2</sub>, 10% Pd/C, EtOAc, t.c., 48 ore; (d) KOH, EtOH, reflux, 3 ore; (e) ICH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H, PhSO<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, Bu<sub>6</sub>Sn<sub>2</sub>, DTBHN, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, 95 °C, 5 ore.

Metilarea acidului (1) cu o soluție eterică de diazometan a condus la esterul (12). Carboazidarea esterului (12) până la azidă (13) a fost realizată cu iodoacetatul de etil în prezența unui exces mic de fenilsulfonilazidă ca sursă de azidă. Hidroliza alcalină a esterului (2) a condus la obținerea acidului (14), care a fost metilat cu diazometan, obținându-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 inițierea radicalică a ambelor procedee, s-au utilizat hexabutyl stannat sau terțbutilhiponitrit sau trietilboranul, obținându-se rezultate similare. Acidul carboxilic (16), rezultat din esterul (15), după reacția de carboazidare a fost metilat cu diazometan, obținându-se azida (17). Etapa finală de reducere a fost realizată cu ambele substraturi (13) și (17) la hidrogenare mediată de paladiu pe cărbune. Lactamele individuale (10) și (11) au fost izolate și purificate prin cromatografie pe coloană cu silicagel. Structura ambelor lactame (10) și (11) a fost demonstrată fără echivoc pe baza datelor spectrale (RMN, IR, MS). Spectrele IR și RMN a lactamelor (10) și (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 activității citotoxice a lactamelor (10) și (11) a fost realizată pe o serie de celule tumorale, iar rezultatele sunt prezentate în tabel. Docetaxelul și staurosporina au fost utilizate ca martori pozitivi care asigură validarea experimentului conform protocolului standard de testări.

Tabel

Activitatea antiproliferativă a lactamelor (10) și (11)

Compusul	Conc. unit	IC <sub>50</sub>								
		hTERT RPE-1	Capan-1	Hap-1	HCT-116	NCI-H460	DND-41	HL-60	K-562	Z-138
<b>10</b>	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
<b>11</b>	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
<b>DT</b>	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
<b>SP</b>	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 compușilor (10) și (11) sunt mult mai mari decât ale medicamentului de referință Cisplatin (IC<sub>50</sub> 16,5 pentru HCT-116 și 5,33 pentru NCI-H460) și comparabile cu medicamentul comercializat în prezent Midostaurina (IC<sub>50</sub> 0,237 pentru HCT-116 și 0,43 pentru NCI-H460, date disponibile ale institutului Sanger: <https://www.cancerrxgene.org>).

Acțiunea selectivă a lactamelor (10) și (11) a fost demonstrată prin teste *in vitro* care au fost efectuate pe celule de retină necanceroase (hTERT RPE-1), iar rezultatele IC<sub>50</sub> au arătat valori mai mari decât pentru celulele tumorale selectate. Indicii de selectivitate (SI) sunt dați de raportul IC<sub>50</sub> pentru celulele normale/IC<sub>50</sub> pentru celulele tumorale corespunzătoare [6]. Valorile calculate sunt prezentate în tabel. Lactamele (10) și (11) sunt compuși stabili în aer și la umiditate, solubili în DMSO și în alți solvenți organici.

#### Lista figurilor

Figurile prezentate mai jos sunt date pentru a demonstra structura atribuită a compușilor propuși, care sunt noi entități chimice:

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

### Exemple de realizare a invenției Sinteza lactamei (10)

O soluție de Et<sub>3</sub>B (1 M în THF, 0,47 ml) s-a adăugat cu seringă în două porțiuni, la amestecul de iodoacetat de etil (39 μL, 0,33 mmol), *ent*-kaurenoat de metil (**12**) (50 mg, 0,16 mmol) și PhSO<sub>2</sub>N<sub>3</sub> (87 mg, 0,47 mmol) în EtOH (2 ml, important: acul seringii trebuie scufundat în amestecul de reacție pentru a evita contactul direct al picăturilor de Et<sub>3</sub>B cu aerul). Amestecul de reacție este agitat la temperatura camerei timp de 2 ore (control CSS). Prelucrarea reacției include diluarea cu soluție apoasă de NaCl (5 ml) și extracția cu Et<sub>2</sub>O (2 x 15 ml). Fazele organice combinate se usucă pe Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtrează și se evaporă solventul sub presiune redusă. Produsul brut se purifică prin cromatografie pe coloană (hexan/EtOAc) obținându-se azida (**13**) (43 mg, 60%). Lichid vâscos incolor.  $[\alpha]_D^{20} = -79.50$  (c=0.84, CHCl<sub>3</sub>). IR (ν, cm<sup>-1</sup>): 2944, 2873, 2096, 1727, 1502. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>: 4.12 (q, J = 7.2 Hz, -CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.62 (s, -CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.42 (t, J = 7.9 Hz, -CH<sub>2</sub>-COOEt), 1.25 (t, J = 7.2 Hz, -CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.14 (s, CH<sub>3</sub>-20), 0.80 (s, CH<sub>3</sub>-22). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub>: 177.90 (s, C-21), 173.38 (s, C-19), 73.07 (s, C-16), 60.54 (t, -CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 56.72 (d, C-5), 55.80 (d, C-9), 51.51 (t, C-15), 51.13 (q, -CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 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<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). GCMS m/z calculat pentru [C<sub>25</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]: 445.28; găsit: 402.3 (M-HN<sub>3</sub>).

O soluție de azidă (**13**) (53 mg, 0,12 mmol) și 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<sub>2</sub> (1 atm). Catalizatorul a fost filtrat, solventul a fost evaporat la presiune redusă și produsul brut a fost purificat prin cromatografie pe coloană (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 90:10), obținându-se lactama (**10**) (42 mg, 95%) în formă de pulbere albă. P.t. 150-152 °C,  $[\alpha]_D^{20} = -77.37$  (c 4.50, CHCl<sub>3</sub>). IR (ν, cm<sup>-1</sup>): 3676, 3209, 2937, 2298, 1712, 1683. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>: 6.68 (s, -NH), 3.63 (s, -CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.30 (m, CH<sub>2</sub>-17), 2.05 (d, J = 11.9 Hz, CH<sub>2</sub>-18), 1.15 (s, CH<sub>3</sub>-20), 0.81 (s, CH<sub>3</sub>-22). <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub>: 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 soluție de acid iodoacetic (71,4 mg, 0,38 mmol), PhSO<sub>2</sub>N<sub>3</sub> (105,0 mg, 0,57 mmoli), Bu<sub>6</sub>Sn<sub>2</sub> (145 μL, 0,28 mmol) și 15-hidroxi-*ent*-kaurenoat de metil (**15**) (64,0 mg, 0,192 mmol) în C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> absolut (2,0 ml) în atmosferă inertă. Amestecul de reacție 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) obținându-se azida (**16**) sub formă de ulei incolor (91 mg, contaminat cu PhSO<sub>2</sub>N<sub>3</sub>). IR (ν, cm<sup>-1</sup>): 3675, 2988, 2955, 2928, 2902, 2108, 1724, 1553. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>3</sub>COD), δ<sub>H</sub>: 3.63 (s, -CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.52 (s, CH-15), 2.46 (t, CH<sub>2</sub>-17), 1.17 (s, CH<sub>3</sub>-20), 0.84 (s, CH<sub>3</sub>-22). <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, D<sub>3</sub>COD) δ<sub>C</sub>: 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 soluție de azidă (**16**) (45 mg, 0,10 mmol) în aproximativ 5 ml Et<sub>2</sub>O la temperatura de 0°C s-a adăugat prin picurare o soluție eterică de CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> până când culoarea galbenă a persistat (0,2-0,25 mmol). Amestecul a fost agitat timp de 30 min și concentrat cu obținerea produsului brut care a fost purificat prin cromatografie pe coloană (pentan/EtOAc 95:5) și a dat azida (**17**) (41 mg, 99%) sub formă de ulei incolor.  $[\alpha]_D^{20} = -55.81$  (c 2.13, CHCl<sub>3</sub>). IR (ν, cm<sup>-1</sup>): 3737, 3526 (w), 2940, 2872, 2853, 2299, 2107, 1725, 1445. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>: 3.69 (s, C-19 (-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)), 3.63 C-21 (s, -CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.40 (s, CH-15), 2.56 (t, J = 7.9 Hz, CH<sub>2</sub>-18), 1.16 (s, CH<sub>3</sub>-20), 0.81 (s, CH<sub>3</sub>-22). <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub>: 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<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)), 51.06 (q, C-19(-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)), 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<sub>25</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 445.28; găsit: 402.3 (M<sup>+</sup>-HN<sub>3</sub>).

O soluție de azidă (**17**) (53 mg, 0,12 mmol) și 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<sub>2</sub> (1 atm). Catalizatorul a fost filtrat, solventul a fost evaporat la presiune redusă și produsul brut a fost purificat prin cromatografie pe coloană (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15), obținându-se lactama (**11**) (16 mg, 35%), lichid vâscos.  $[\alpha]_D^{25} = -90.85$  (c 3.0, CHCl<sub>3</sub>). IR (ν, cm<sup>-1</sup>): 3351, 2933, 2871, 2322, 1722, 1685, 1552. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>: 6.73 (s, NH), 3.63 (s, -CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.49 (s, CH-15), 1.16 (s, CH<sub>3</sub>-20), 0.81 (s, CH<sub>3</sub>-22). <sup>13</sup>C RMN (100

5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub>: 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<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 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<sub>23</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>4</sub> (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

10 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 tulpinelor 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.

15 Citotoxicitatea compușilor revendicați (10) și (11) a fost determinată conform metodei de imagistică în timp real pe microplășe 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 înșămânțate la o densitate între 500 și 1500 celule per godeu, iar tulpinile suspendate DND-41, HL-60, K-562 și Z-138 au fost înșămânțate 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<sup>-3</sup> μM. Microplășele 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 20 cuantificată în baza procentului de confluență celulară după cum a fost analizat de dispozitivul IncuCyte®. Valorile IC<sub>50</sub> 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 IC<sub>50</sub> sunt prezentate în tabel.

#### (56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Ukiya M., Sawada S., Kikuchi T., Kushi Y., Fukatsu M. and Akihisa T. Cytotoxic and apoptosis-inducing activities of steviol and isosteviol derivatives against human cancer cell lines. *Chemistry & Biodiversity*, 2013, 10(2), pp. 177-188.
2. Malki A., Laha R. and Bergmeier S.C. Synthesis and cytotoxic activity of MOM-ether analogs of isosteviol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry letters*, 2014, 24(4), pp. 1184-1187.
3. Zhang T., Lu L.H., Liu H., Wang J.W., Wang R.X., Zhang Y.X. and Tao J.C. D-ring modified novel isosteviol derivatives: Design, synthesis and cytotoxic activity evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2012, 22(18), pp. 5827-5832.
4. 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, 19(11), pp. 18676-18689.
5. Zhu S.L., Wu Y., Liu C.J., Wei C.Y., Tao J.C. and Liu H.M. Design and stereoselective synthesis of novel isosteviol-fused pyrazolines and pyrazoles as potential anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 65, pp. 70-82.
6. Badisa R.B., Darling-Reed S.F., Joseph P., Cooperwood J.S., Latinwo L.M. and Goodman C.B. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. *Anticancer research*, 2009, 29(8), pp.2993-2996.
7. Okoye T.C., Akah P.A., Nworu C.S. and Ezike A.C. Kaurenoic 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, 4(5), p. 579-589.
8. US 10196344 B2 2019.02.05
9. Hongjie Z. and Handong S. Diterpenoids from *Rabdosia flexicaulis*. *Phytochemistry*, 1989, 28(12), pp.3534-3536.
10. Guo L., Tsang S.W., Zhang T.X., Liu K.L., Guan Y.F., Wang B., Sun H.D., Zhang H.J. and Wong



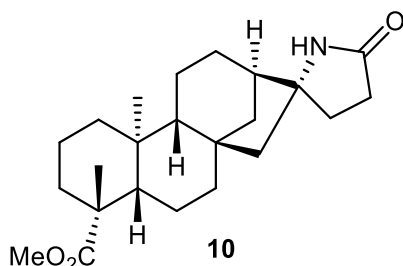
M.S. Efficient semisynthesis of (-)-pseudoirroratin A from (-)-flexicaulin A and assessment of their antitumor activities. ACS Medicinal Chemistry Letters, 2017, 8(3), pp. 372-376.

11. Xia Y., Lam C.S., Li W., Sarwar M., Liu K., Lee K.M., Zhang H.J. and Tsang S.W. Flexicaulin A, an ent-kaurane diterpenoid, activates p21 and inhibits the proliferation of colorectal carcinoma cells through a non-apoptotic mechanism. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(8), p.1917.

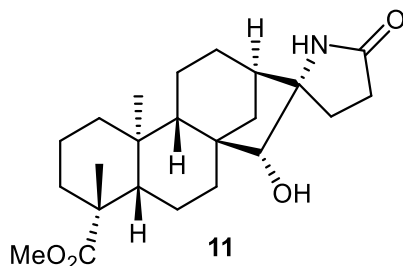
12. US 10493056 B2 2019.12.03

**(57) Revendicări:**

1. Ester metilic al acidului (16R)-spiro[pirolidin-2'-on-5',16-ent-17-norkauran]-19-oic cu formula (10):



2. Ester metilic al acidului (15R,16S)-spiro[pirolidin-2'-on-5',16-ent-17-nor-15-hidroxikauran]-19-oic cu formula (11):



3. Compușii (10) sau (11) conform revendicărilor 1 sau respectiv 2 pentru utilizare în calitate de inhibitori selectivi ai proliferării celulelor tumorale selectate din grupul care cuprinde liniile Capan-1 adenocarcinomului pancreatic, Hap-1 leucemiei mieloide cronice, HCT-116 carcinomului colorectal și NCI-H460 carcinomului pulmonar.

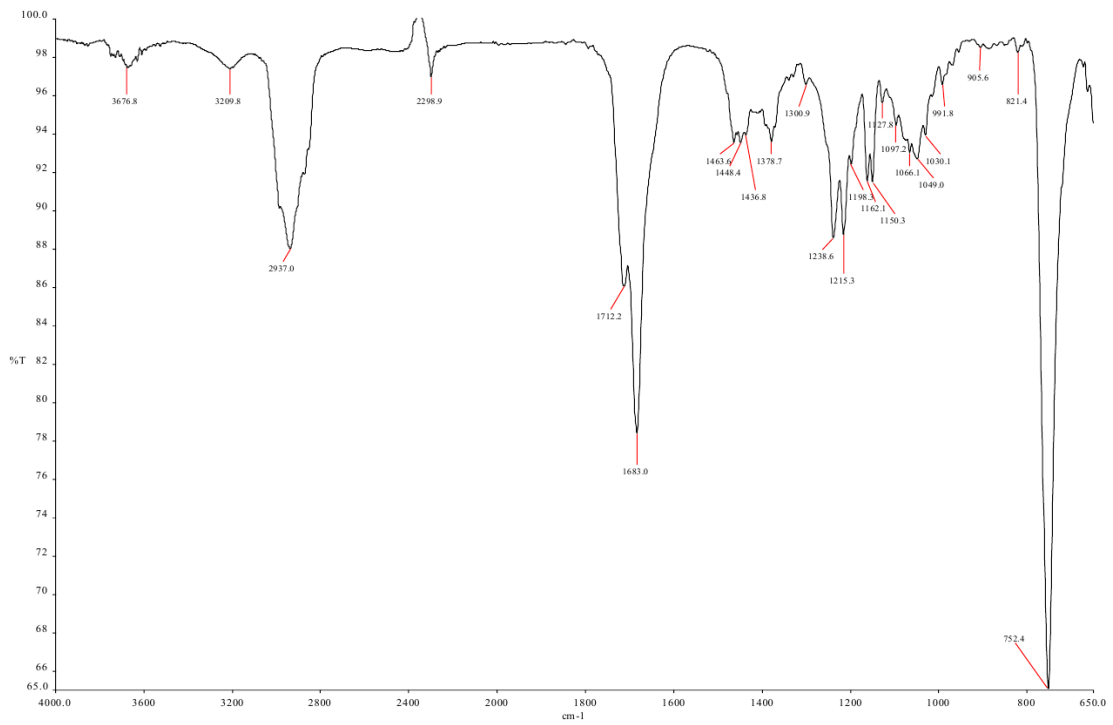


Fig. 1

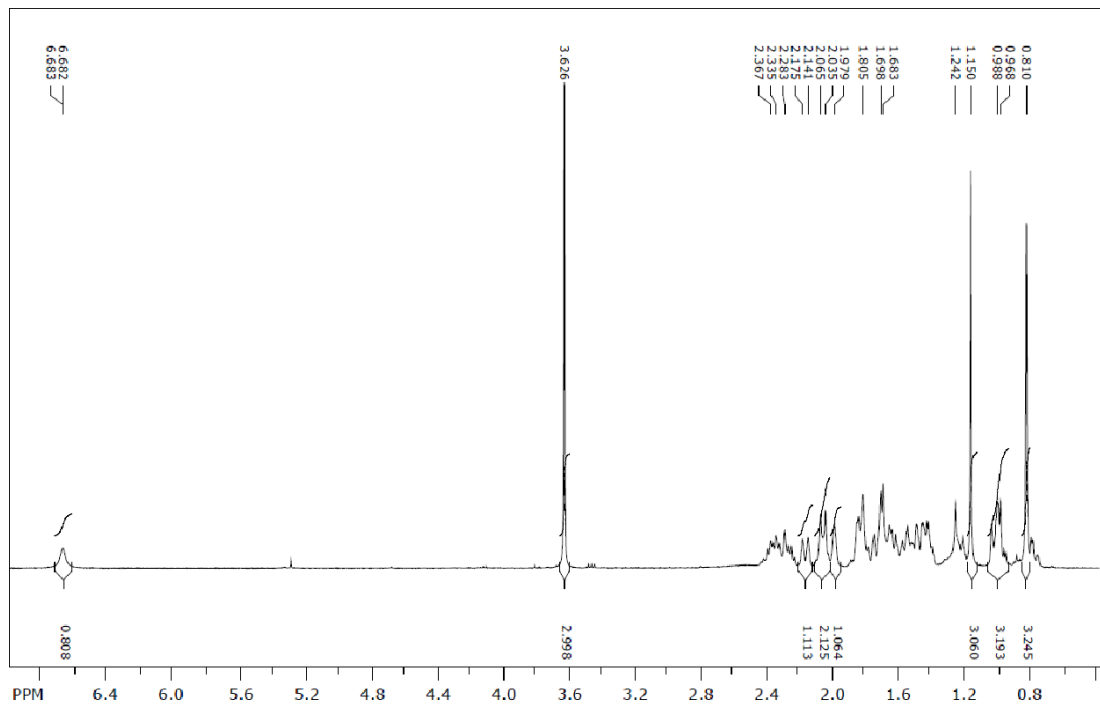


Fig. 2

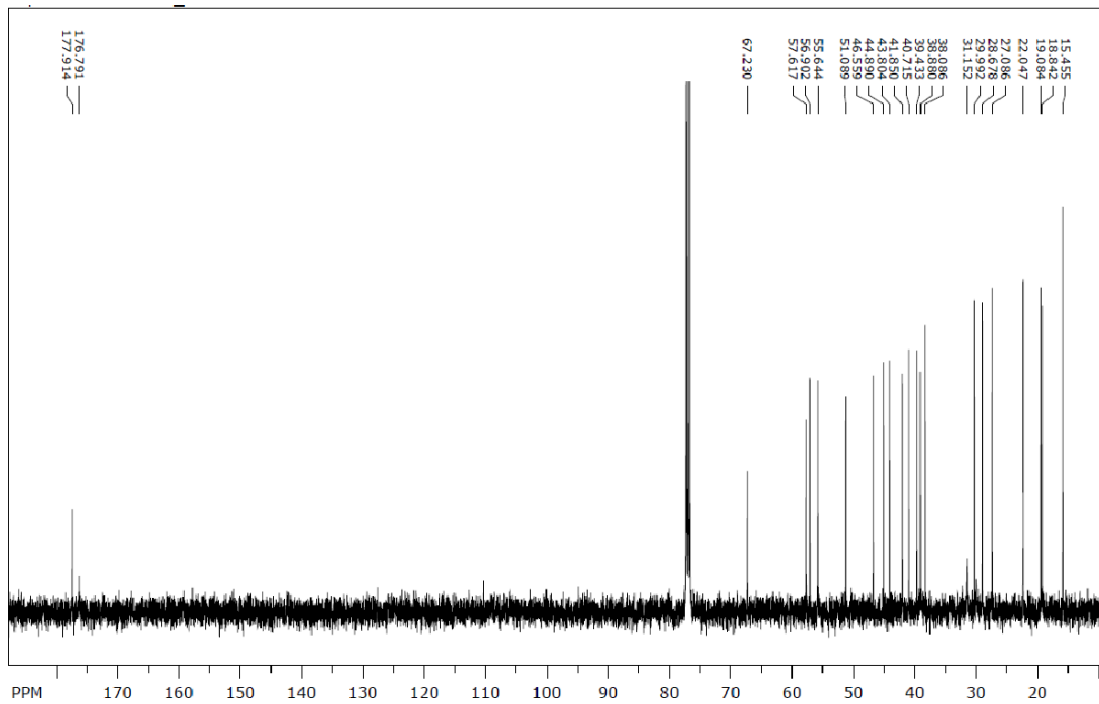


Fig. 3

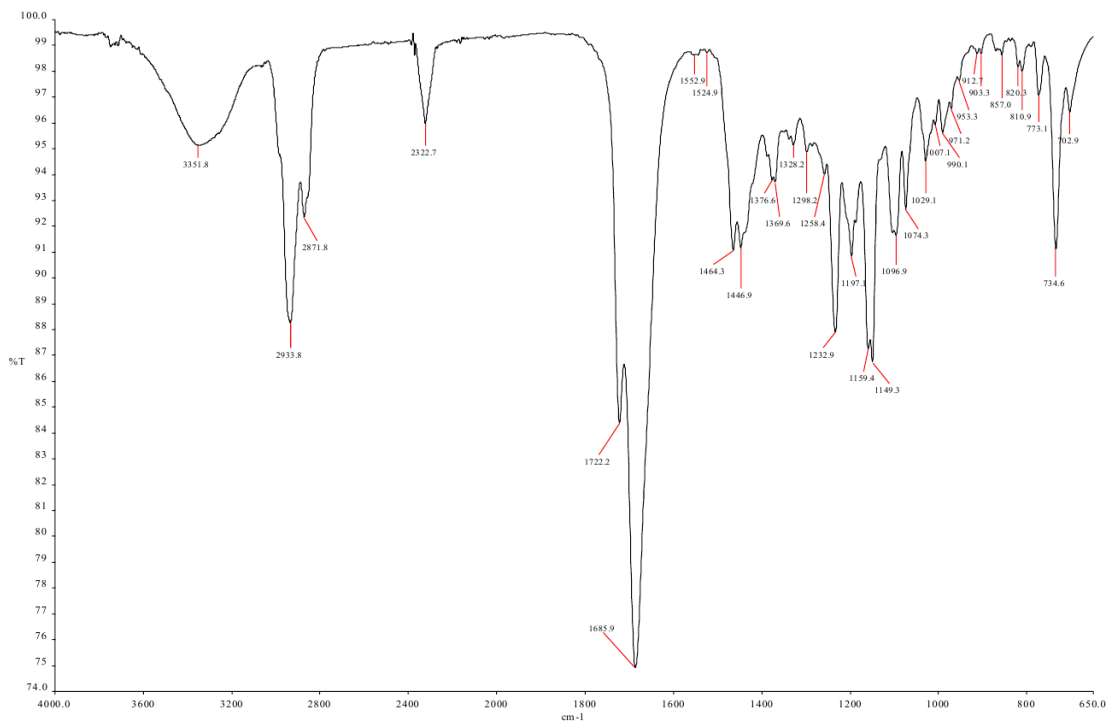


Fig. 4

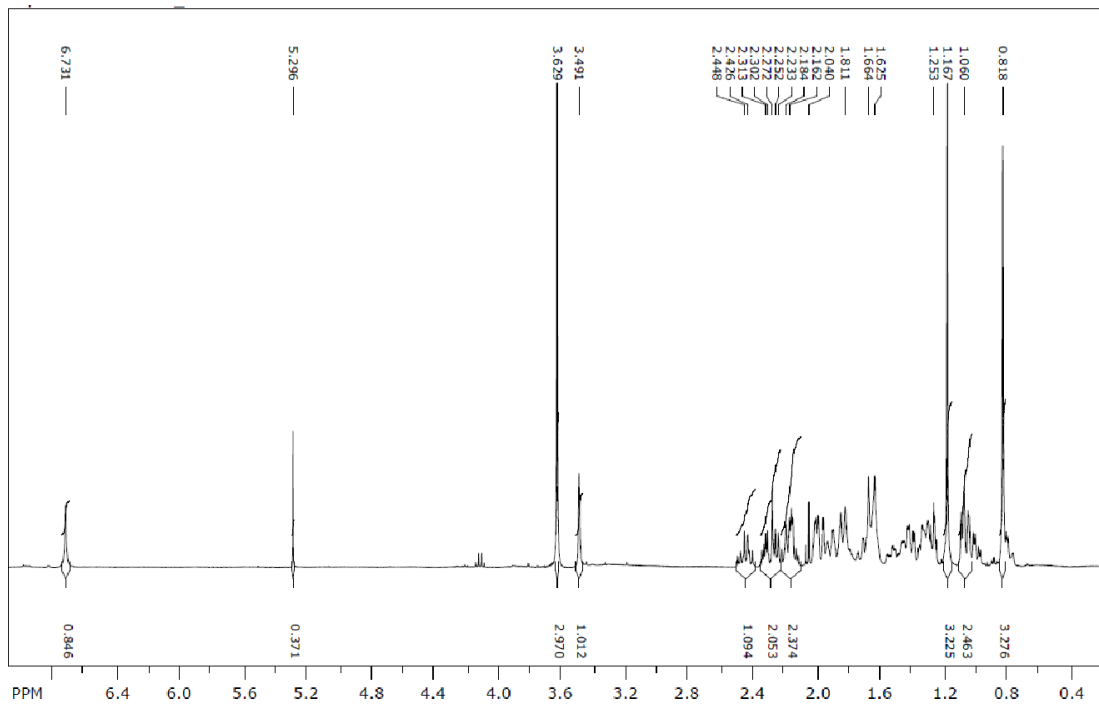


Fig. 5

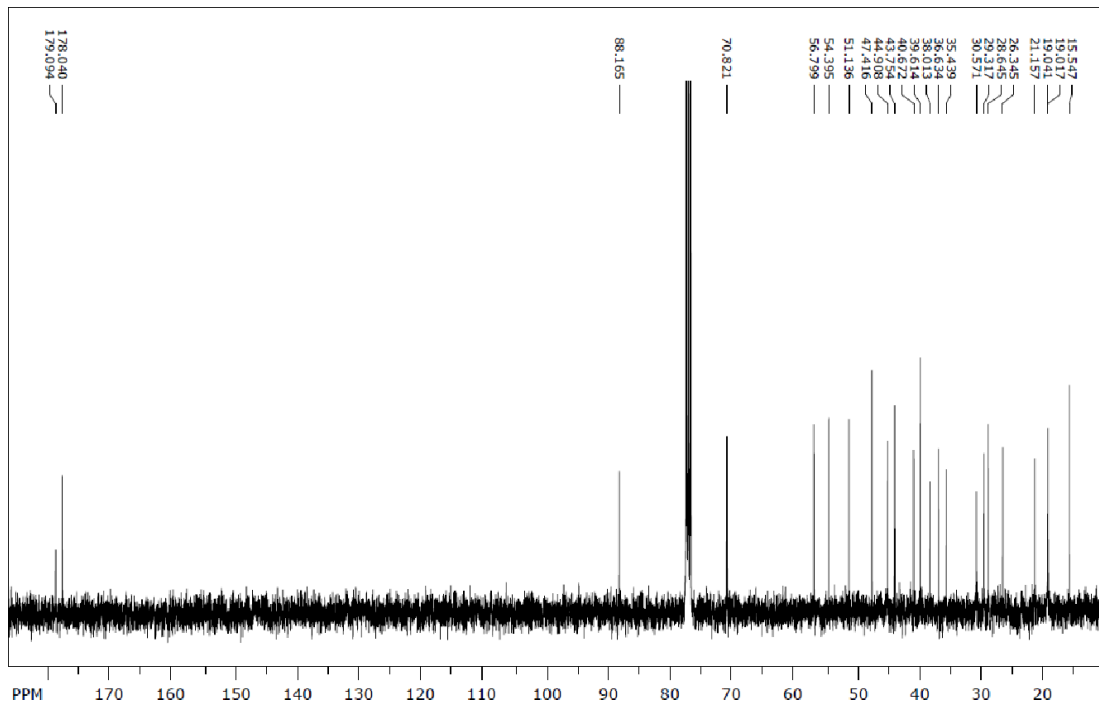


Fig. 6

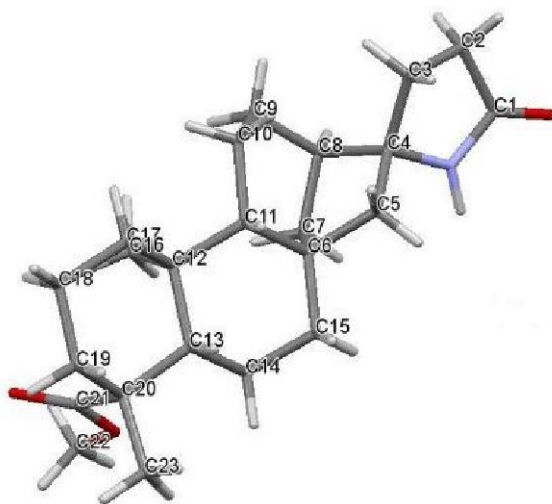


Fig. 7