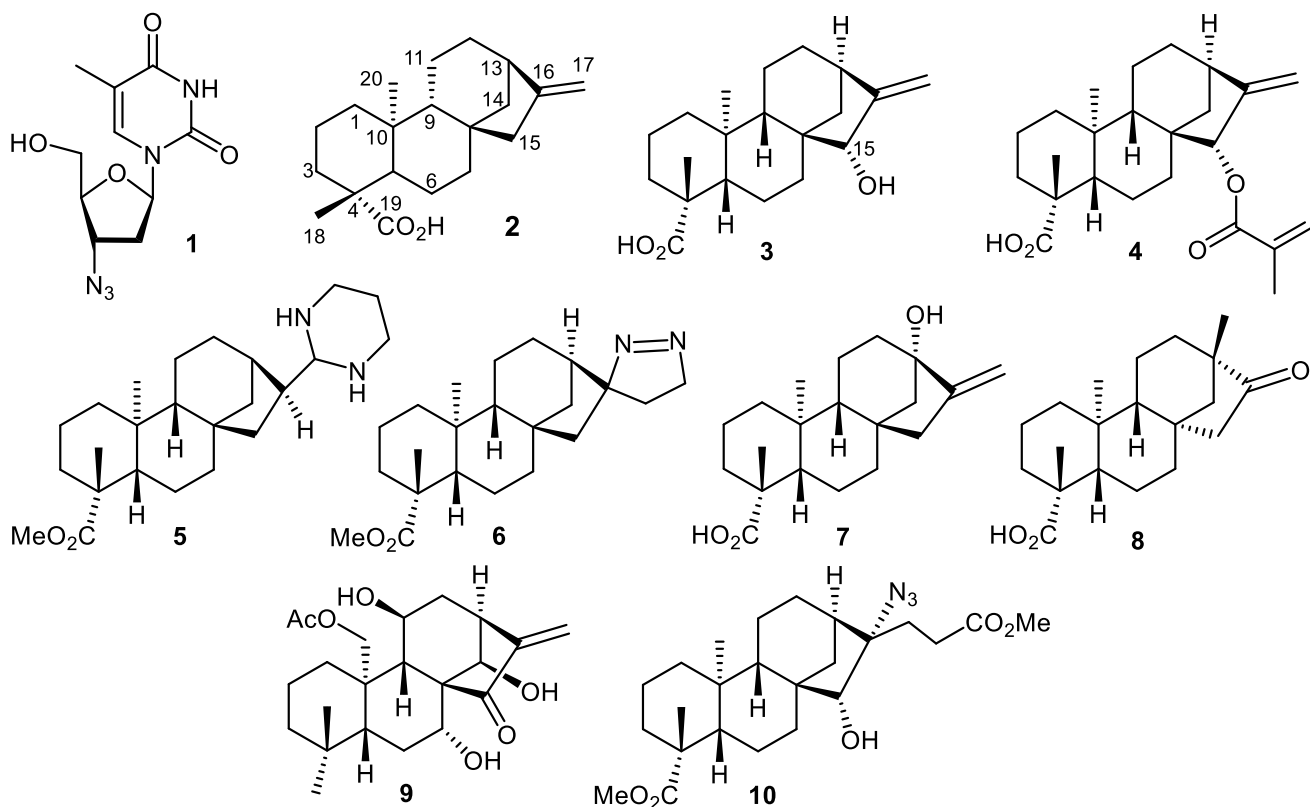


Invenția se referă la chimia compușilor naturali și chimia medicinală, în special la un derivat al acidului *ent*-kaurenoic ce conține o grupă funcțională azidă, care prezintă proprietăți citotoxice selective față de celulele canceroase umane și poate fi utilizat ca agent chimioterapeutic pentru tratamentul afecțiunilor oncologice.

Azidele reprezintă atât materiale organice, cât și anorganice și sunt derivați ai acidului hidrazoic  $\text{HN}_3$ . Azidele organice includ grupa azidă cuplată cu diferiți radicali alchil sau alți heteroatomi. Acidul hidrazoic este un compus foarte toxic și exploziv. Dimpotrivă, majoritatea azidelor organice sunt compuși stabili, lipsiți de o toxicitate relevantă. Nu sunt disponibile date despre prezența azidelor în sursele naturale, dar necătând la caracterul lor aparent ne-natural, grupele funcționale azide sunt din ce în ce mai utilizate în studiile chimiei medicinale. În afară de utilizarea lor în reacțiile “click”, care sunt nucleul chimiei de conjugare moderne prin legături triazolice, azidele organice s-au dovedit eficiente în calitate de farmacofori [El-Kardocy A. et al. Aryl azide-sulfonamide hybrids induce cellular apoptosis: synthesis and preliminary screening of their cytotoxicity in human HCT116 and A549 cancer cell lines. *Medicinal Chemistry Research*, 2019, 28(11), pp.2088-2098; Fu D.J. et al. Structure-activity relationship studies of  $\beta$ -lactam-azide analogues as orally active antitumor agents targeting the tubulin colchicine site. *Scientific reports*, 2017, 7(1), pp.1-12; Fan J. et al. Effect of trans-2,3-dimethoxycinnamoyl azide on enhancing antitumor activity of romidepsin on human bladder cancer. *Clinical cancer research*, 2008, 14(4), pp.1200-1207; Spletstoser J.T. et al. Synthesis and Anti-Tubulin Activity of a 3'-(4-Azidophenyl)-3'-dephenylpaclitaxel Photoaffinity Probe. *Journal of medicinal chemistry*, 2004, 47(26), pp.6459-6465; Zhang X. et al. Azido-containing aryl  $\beta$ -diketo acid HIV-1 integrase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 2003, 13(6), pp.1215-1219; Pinney K.G. et al. Synthesis and biological evaluation of aryl azide derivatives of combretastatin A-4 as molecular probes for tubulin. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2000, 8(10), pp.2417-2425]. Cel mai relevant exemplu este medicamentul antiretroviral zidovudina (1), utilizat pentru prevenirea și tratarea HIV/SIDA. Interacțiunea farmacoforului azidic cu țintele celulare este uneori legată de o reducere ipotetică a grupei azide în amină [Cretton E.M. and Sommadossi J.P. Reduction of 3'-azido-2',3'-dideoxynucleosides to their 3'-amino metabolite is mediated by cytochrome P-450 and NADPH-cytochrome P-450 reductase in rat liver microsomes. *Drug metabolism and disposition*, 1993, 21(5), pp.946-950]. În special, efectul pro-medicamentos al azidelor din medicamentele antivirale cunoscute a fost descris în brevetul US6949521 B2 2005.09.27.

Un alt brevet recent descrie compozițiile farmaceutice ale azidelor terpenice liniare ca aditivi sinergetici pentru agenții antivirali [US10179143 B2 2019.01.15]. În acest context, este convenabilă utilizarea diterpenoidelor *ent*-kauranice în calitate de schelete disponibile pentru încorporarea grupei azide. Țesutul vegetal de floarea-soarelui (*Helianthus Annuus*), ce reprezintă în prezent deșeuri după recoltare, conține cantități mari de acizi *ent*-kaurenoic (2) și *ent*-15-hidroxi-16-kaurenoic (3), ultimul în formă de ester al acidului angelic (4), 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, p. 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]. Din cât se cunoaște, nu a fost raportat până în prezent niciun compus *ent*-kauranic bioactiv cu grupe funcționale azide.

Există puține date privind introducerea atomului de azot în scheletul carbonic al kauranilor, majoritatea transformărilor chimice ale *ent*-kauranilor naturali incluzând modificarea grupei carboxil din ciclul A sau funcționalizarea legăturii duble din ciclul D cu substituenți oxigenați [Morarescu O. Synthetic transformations of *ent*-kaurenoic acid. *Chem. J. Moldova*, 2015, 10 (1), p. 9-19]. Totuși, grupele funcționale heteroatomice în bază de azot sunt farmacofori relevanți în diterpenoidele biologic active și exemplele similare pot fi găsite în literatura de specialitate. De exemplu, derivatul diterpenic perhidropirimidinic (5) aferent structurii *ent*-kauranice are o citotoxicitate foarte modestă împotriva liniilor de celule canceroase [1]. O pirazolină similară (6) la fel nu a demonstrat 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]. Dezavantajul acidului *ent*-kaurenoic (2) este legat de o citotoxicitate modestă [2], în special o citotoxicitate foarte scăzută împotriva liniilor celulare de cancer pancreatic (PANC-1) cu  $\text{IC}_{50} = 0,52 \text{ M}$  [3]. În legătură cu aceasta, lipsesc date privind indicele de selectivitate ale compușilor activi, prin comparația rezultatelor testelor *in vitro* pe celule normale și maligne [4].

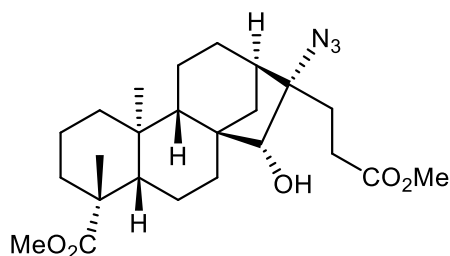


Exemplele recente ale altor compuși *ent*-kauranici ce posedă diferite proprietăți terapeutice au fost descrise în mai multe publicații. Derivații citotoxici ai steviolului (7) au fost descriși de Ukiya et al. [5]. Modificarea compusului natural a fost efectuată prin reducerea fragmentului carboxilic, urmată de derivatizarea alcoolului primar rezultat cu diferiți agenți de acilare. Derivații O-acilați au prezentat citotoxicitate puternică împotriva mai multor linii de celule canceroase (celule canceroase HL60- leucemie, A549 –pulmonare, AZ521 – stomac, SK-BR-3 –mamare) cu valori micromolare de IC<sub>50</sub> cu o singură cifră. Totuși, sinteza chimică a steviolului din glicozidele naturale corespunzătoare nu este suficient de bine elaborată, hidroliza acidă a glicozidelor din stevia conducând la o regrupare de schelet a compusului (7), ce rezultă într-o conversie cantitativă la așa-numitul izo-steviol (8). Spre deosebire de alcoolul (7), compusul regrupat (8) a fost subiectul unor modificări chimice care au condus la obținerea mai multor compuși cu proprietăți terapeutice relevante, inclusiv apoptotice [6], citotoxice [7], [8] și acțiuni antiproliferative [9].

Cel mai recent exemplu de derivați citotoxici *ent*-kauranici de origine naturală este compusul flexicaulina A (9) [10]. S-a dovedit că acest compus posedă citotoxicitate împotriva celulelor carcinomului de colon într-un mod selectiv, arătând o toxicitate minimă la animale [11]. Citotoxicitatea unei serii de derivați sintetici cu scheletul flexicaulinei A (9) a fost dezvăluită într-un brevet recent [12]. Dezavantajele acestei invenții constau în faptul că, precursorul natural (9) 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 (9) dezvăluit în [12]. Niciunul dintre aceștia nu include grupe funcționale azide.

Problema soluționată de invenția dată constă în sinteza unui nou derivat al compusului diterpenic natural abundent acidul *ent*-kaurenoic, care include grupe azide și manifestă o activitate citotoxică selectivă împotriva celulelor tumorale maligne.

Soluția pentru această problemă este oferită de sinteza unui derivat al acidului *ent*-15-hidroxi-16-kaurenoic (3) ce conține o grupă funcțională azidă terțiară - metil *ent*-15-hidroxi-16-azido-17-carboximetoximetilkauranoat cu formula:



care posedă activitate citotoxică selectivă față de celulele tumorale maligne.

Rezultatul invenției constă în compusul nou (10) cu o toxicitate selectivă împotriva liniilor de celule canceroase Capan-1 (adenocarcinom pancreatic), NCI-H460 (carcinom pulmonar) și DND-41 (leucemie limfoblastică acută). Rezultatul invenției este cauzat de descoperirea faptului că încorporarea unei azide terțiare în compusul natural selectat, împreună cu esterificarea grupei carboxilice și modificarea ușoară a ciclului D și catenei laterale, determină o activitate citotoxică selectivă.

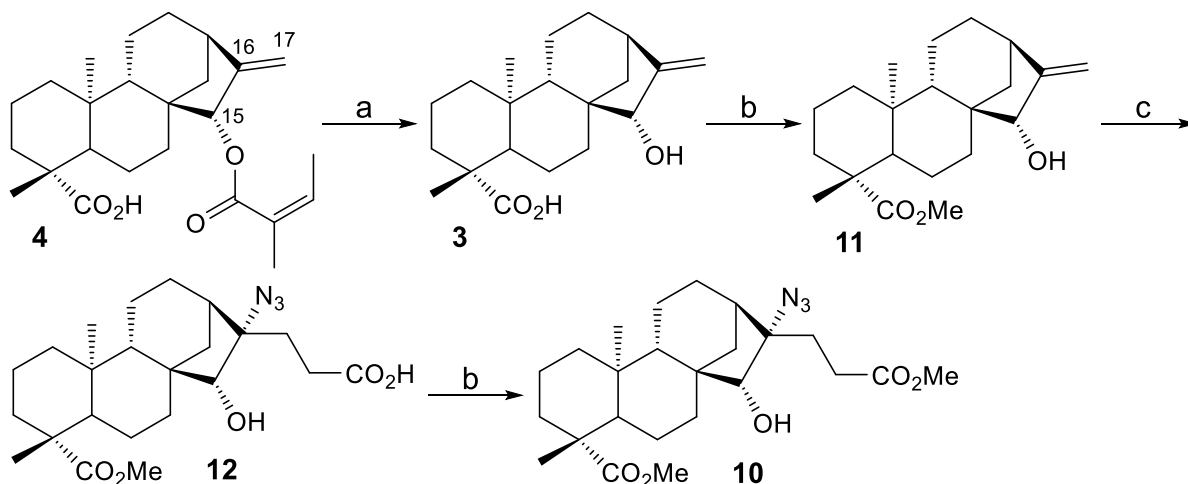
Investigarea profilului de activitate biologică a azidei (10) a arătat o citotoxicitate relevantă împotriva mai multor linii celulare tumorale și o citotoxicitate mult mai mică față de celulele normale de retenție (hTERT RPE-1). Valorile calculate ale indicelui de selectivitate (SI) pentru liniile de celule tumorale care sunt inhibitate de compusul (10) la valori ale  $IC_{50}$  sub  $10 \mu M$  atestă un potențial real de valorificare terapeutică (datele din tabel). În particular, compusul (10) este citotoxic împotriva celulelor Capan-1 (adenocarcinom pancreatic), NCI-H460 (carcinom pulmonar) și DND-41 (leucemie limfoblastică acută) la valori ale  $IC_{50}$  egale respectiv cu  $8,3 \mu M$ ,  $0,6 \mu M$ ,  $6,6 \mu M$  și ale indicilor de selectivitate (calculați prin raportul  $IC_{50}$  pentru celulele normale față de  $IC_{50}$  pentru celulele tumorale corespunzătoare) de respectiv 3,1, 43,2 și 3,9 unități.

Compusul revendicat are un schelet carbonic asemănător cu cel al metil *ent*-15-hidroxi-16-kaurenoatului (11) cunoscut (schemă), având cu doi atomi de carbon suplimentari care formează o catenă laterală carboximetilică în poziția C-17, împreună cu un fragment de azidă terțiară la atomul de carbon C-16.

Compusul (10) poate fi obținut la modificarea chimică a *ent*-15-hidroxi-16-kaurenoatului de metil (11) în doar două etape sintetice. Astfel, conversia compusului inițial (11) în azida țintă (10) se realizează la o adădire radicalică de carboazidare cu acidul iodoacetic în prezență de fenilsulfonilazidă urmată de o metilare a grupei carboxil libere.

Avantajele compusului (10) sunt structura chimică bazată pe un compus natural diterpenic ușor disponibil în cantități nelimitate dintr-o materie primă care reprezintă o cultură industrială dominantă în zona europeană (floarea-soarelui). Mai exact, materia primă pentru producerea compusului (10) este reziduul vegetal al recoltei de floarea-soarelui, din care este extras acidul *ent*-15-angeloiloxi-16-kaurenoic (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. Chem. J. Moldova, 2013, 8, p. 90-93; Grinco M., Chetaru 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]. Avantajul cel mai relevant este activitatea citotoxică pronunțată și indicele de selectivitate ridicat pentru liniile de celule tumorale Capan-1 (adenocarcinom pancreatic), NCI-H460 (carcinom pulmonar) și DND-41 (leucemie limfoblastică acută).

Transformările ce demonstrează sinteza azidei revendicate (10) sunt prezentate în schemă.



Schemă. Reagenți și condiții: (a) KOH, EtOH, reflux, 3 ore; (b)  $CH_2N_2$ ,  $Et_2O$ , 0,5 ore; (c)  $ICH_2CO_2H$ ,  $PhSO_2N_3$ ,  $Bu_6Sn_2$ , DTBHN,  $C_6H_6$ ,  $95^\circ C$ , 5 ore.

Hidroliza alcalină a esterului (4) a condus la obținerea acidului (3), care a fost metilat cu diazometan, obținându-se esterul (11). Carboazidarea esterului (11) a fost realizată cu un randament mai bun utilizând acidul iodoacetic ca agent de alchilare. Pentru inițierea radicalică s-a utilizat hexabutyl stanatul în prezență de terțbutilhiponitrit. Acidul carboxilic (12) rezultat din esterul (11) după reacția de carboazidare a fost metilat cu diazometan obținându-se azida (10). Azida individuală (10) a fost izolată și purificată prin cromatografie pe coloană pe silicagel. Structura compusului (10) a fost demonstrată fără echivoc în baza datelor spectrale (RMN, IR, MS). Spectrele IR și RMN ale azidei (10) sunt prezentate în figurile 1-3.

Evaluarea activității citotoxice a azidei (10) a fost efectuată 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 azidei *ent*-kauranice (10)

Compusul	Unit. conc.	IC <sub>50</sub>								
		hTERT RPE-1	Capan-1	Hap-1	HCT-116	NCI-H460	DND-41	HL-60	K-562	Z-138
10	μM	25,9±0,3	8,3±1,1 SI=3,1	40,4±8,6	9,9±2,7	0,6±0,2 SI=43,2	6,6±1,3 SI=3,9	41,1±15,9	36,9±0,2	21,6±5,4
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.

Nivelul de activitate a compusului (10) depășește semnificativ medicamentul de referință Cisplatina (IC<sub>50</sub> 5,33 pentru NCI-H460) situându-se în limite similare cu medicamentul comercializat în prezent Midostaurina (IC<sub>50</sub> 0,43 pentru NCI-H460, date ale Institutului Sanger: <https://www.cancerrxgene.org>).

Ațiunea selectivă a azidei (10) a fost demonstrată prin testele *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, rezultând în valori ale indicilor de selectivitate (SI) ce asigură convingător un potențial terapeutic (tabel).

Azida (10) este un compus stabil în aer și la umiditate, solubil în DMSO și alți solvenți organici.

Invenția este explicată în continuare urmând figurile prezentate mai jos pentru a demonstra structura atribuită a compusului revendicat și activitatea citotoxică selectivă.

Figurile desenelor reprezintă:

- fig. 1, spectrul IR al azidei (10);
- fig. 2, spectrul <sup>1</sup>H RMN al azidei (10);
- fig. 3, spectrul <sup>13</sup>C RMN al azidei (10);

#### Exemple de realizare a invenției

##### Sinteza azidei (10)

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 mmol), Bu<sub>6</sub>Sn<sub>2</sub> (145 μL, 0,28 mmol) și 15-hidroxi-*ent*-kaurenoat de metil (11) (64,0 mg, 0,192 mmol) în C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> absolut (2,0 mL). Amestecul de reacție a fost refluxat în atmosferă inertă timp de 5 ore (control CC). Produsul brut a fost purificat prin cromatografie pe coloană pe silicagel (eter de petrol/EtOAc 70:30) obținându-se azida (12) 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 (12) (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 (10) (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 (s, 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>).

##### Testele de citotoxicitate *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 citotoksici staurosporina și docetaxelul au fost obținuți de la Selleckchem (Munich, Germania). Toate soluțiile stock au fost preparate în DMSO.

Citotoxicitatea compusului revendicat (10) 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 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  $6,4 \times 10^{-3}$   $\mu\text{M}$ . Microplășele au fost incubate la  $37^\circ\text{C}$  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  $\text{IC}_{50}$  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  $\text{IC}_{50}$  sunt prezentate în tabel.