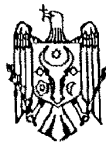




MD 4792 B1 2022.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4792** (13) **B1**
(51) Int.Cl: C07D 209/96 (2006.01)
C07C 61/125 (2006.01)
A61K 31/015 (2006.01)
A61K 31/403 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

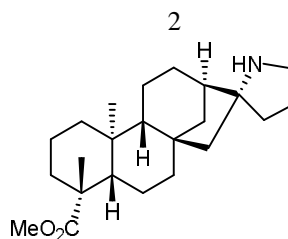
In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2020 0034 (22) Data depozit: 2020.05.04 (41) Data publicării cererii: 2021.11.30, BOPI nr. 11/2021	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2022.02.28, BOPI nr. 2/2022
(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE CHIMIE, MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI CERCETĂRII, MD; KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN, BE; UNIVERSITAT BERN, CH	
(72) Inventatori: KULCIȚKI Veaceslav, MD; GÎRBU Vladilena, MD; PRUTEANU Elena, MD; RENAUD Philippe, CH; DAELEMANS Dirk, BE; UNGUR Nikon, MD	
(73) Titulari: INSTITUTUL DE CHIMIE, MINISTERUL EDUCAȚIEI ȘI CERCETĂRII, MD; KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN, BE; UNIVERSITAT BERN, CH	
(74) Mandatar autorizat: JOVMIR Tudor	

(54) Ester metilic al acidului (16R)-spiro[pirolidin-2?,16-ent-17-norkauran]-19-oic cu activitate citotoxică selectivă

(57) Rezumat:

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

Conform invenției, se revendică compusul ester metilic al acidului (16R)-spiro[pirolidin-2?,16-ent-17-norkauran]-19-oic cu formula de structură:



Compusul revendicat posedă activitate citotoxică selectivă împotriva liniilor de celule tumorale Hap-1 și K-562 (leucemie mieloidă cronică), NCI-H460 (carcinom pulmonar), DND-41 (leucemie limfoblastică acută), HL-60 (leucemie mieloidă acută) și Z-138 (limfom non-Hodgkin).

Revendicări: 2

Figuri: 4

MD 4792 B1 2022.02.28

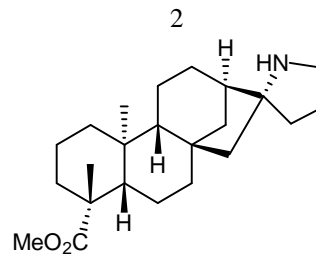
(54) (16R)-Spiro[pyrrolidine-2?,16-*ent*-17-norkauran]-19-oic acid methyl ester with selective cytotoxic activity

(57) Abstract:

1

The invention relates to the chemistry of natural compounds and medicinal chemistry, in particular to an *ent*-kaurenoic acid derivative containing a pyrrolidine functional group, which exhibits selective cytotoxic properties in relation to human cancer cells and can be used as a chemotherapeutic agent for the treatment of oncological diseases.

According to the invention, claimed is the compound (16R)-spiro[pyrrolidine-2?,16-*ent*-17-norkauran]-19-oic acid methyl ester with the structural formula:



The claimed compound has selective cytotoxic activity against the Hap-1 and K-562 (chronic myeloid leukemia), NCI-H460 (lung carcinoma), DND-41 (acute lymphoblastic leukemia), HL-60 (acute myeloid leukemia) and Z-138 (non-Hodgkin lymphoma) tumor cells line.

Claims: 2

Fig.: 4

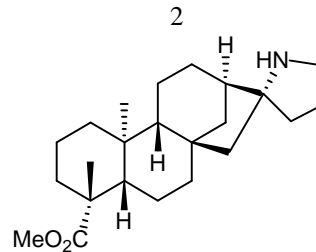
(54) Метилловый эфир (16R)-спиро[пирролидин-2?,16-*энт*-17-норкауран]-19-овой кислоты с селективной цитотоксической активностью

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к химии природных соединений и медицинской химии, в частности к производному *энт*-кауреновой кислоты, содержащему пирролидиновую функциональную группу, которое представляет селективные цитотоксические свойства по отношению к раковым клеткам человека и может быть использовано в качестве химиотерапевтического агента для лечения онкологических заболеваний.

Согласно изобретению, заявлено соединение метилловый эфир (16R)-спиро[пирролидин-2?,16-*энт*-17-норкауран]-19-овой кислоты с структурной формулой:



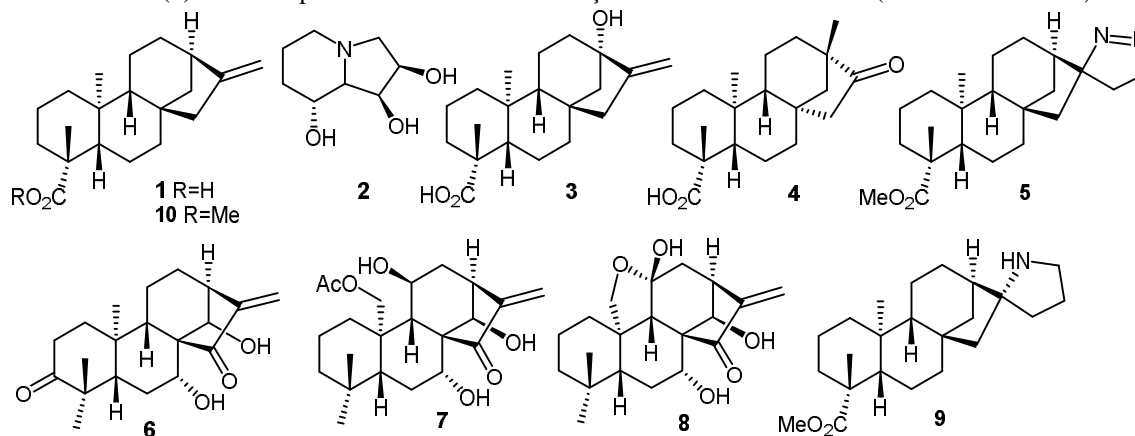
Заявленное соединение обладает селективной цитотоксической активностью против линии раковых клеток Hap-1 и K-562 (хроническая миелоидная лейкемия), NCI-H460 (карцинома лёгких), DND-41 (острая лимфобластическая лейкемия), HL-60 (острая миелоидная лейкемия) и Z-138 (неходжкинская лимфома).

П. формулы: 2

Фиг.: 4

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 agent chimioterapeutic pentru tratarea bolilor canceroase a unui derivat ce include o grupă funcțională de pirolidină suplimentară la scheletul carbonic diterpenic extins al acidului *ent*-kaurenoic (**1**) – un component al extractului din deșeurile de floarea-soarelui (*Helianthus annuus*).



- 10 Pirolidinele sunt o clasă de compuși chimici care se utilizează pe larg la obținerea medicamentelor. Heterociclul saturat cu cinci membri este integrat în arhitectura chimică mai complexă în diferite moduri: fie în mod izolat, condensat sau în mod spiro. Alte heterocicluri similare, cum ar fi pirolidonele sau
- 15 chiar lactamele, sunt atribuite uneori la pirolidinele funcționalizate, în ciuda criteriului formal care definește pirolidina ca un tetrahidropirol saturat. Alcaloizii naturali sunt abundenți în derivați de pirolidină, nicotina fiind unul dintre cele mai cunoscute exemple. Alți reprezentanți sunt alcaloizii din Coca precum igrina, medicamente precum prociclidina și bepridil. Răspândirea și activitatea biologică a pirolidinelelor a fost discutată pe larg în mai multe studii recente (O'Hagan D. Pyrrole, pyrrolidine, pyridine, piperidine and tropane alkaloids. Natural product reports, 2000, 17(5), pp.435-446; Watson A.A., Fleet G.W., Asano N., Molyneux R.J. and Nash R.J. Polyhydroxylated alkaloids—natural
- 20 occurrence and therapeutic applications. Phytochemistry, 2001, 56(3), pp.265-295). Activitatea biologică a compușilor pirolidinici cunoscuți este adesea legată de capacitatea lor de a mima structura azacarbhidraților care sunt cunoscuți ca inhibitori ai glicozidazelor și glicoziltransferazelor implicate în dezvoltarea diferitelor boli, inclusiv cancerul metastatic. De exemplu, Golgi α -manozidaza II umană (hGMII) este o enzimă cheie în procesarea N-glicanului, iar inhibarea acesteia este o strategie anticancer cunoscută (Cheng T. J. R., Chan T. H., Tsou E. L., Chang S. Y., Yun W. Y., Yang P. J. and Cheng W. C. From Natural Product-Inspired Pyrrolidine Scaffolds to the Development of New Human Golgi α -Mannosidase II Inhibitors. Chemistry—An Asian Journal, 2013, 8(11), 2600-2604). Au fost raportați mulți inhibitori naturali sau sintetici pentru diferite GMII. De exemplu, swainsonina (**2**) este un puternic inhibitor al GMII și, de asemenea, reduce celulele tumorale și unele disfuncții hematologice. Din păcate,
- 30 utilizarea sa este asociată cu reacții adverse, cum ar fi co-inhibirea α -manozidazelor lizozomale care limitează studiul său clinic.

- Pe de altă parte, diverse pirolidine funcționalizate au găsit o aplicație largă în neurofiziologie datorită efectului lor de a spori activitatea creierului la persoanele sănătoase și de a îmbunătăți funcția cognitivă, în special funcțiile executive, memoria, creativitatea sau motivația. Medicamentele nootrope binecunoscute din seria racetamilor se bazează pe farmacoforul heterociclic pirolidona (Hamaguchi Fumiko, et al. Pyrrolidine derivatives as nootropic agents. US5110823, 1992).
- 35

- Cu excepția efectului stimulat, unele pirolidine prezintă potențial terapeutic pentru tratamentul depresiilor și a bolilor neurodegenerative. Câteva brevete recente dezvăluie o serie de pirolidine spiro-funcționalizate cu diverse activități biologice și aplicații terapeutice (Khan M. Amin. Spiro-lactam NMDA receptor modulators and uses thereof. US10196401, 2019. Lowe III John A., Khan M. Amin. Spiro-lactam NMDA receptor modulators and uses thereof. US10441572, 2019). Aceste spiro-lactame vizează receptorii N-metil-d-aspartatului (NMDA) care controlează fluxul ionilor bivalenți și monovalenți în celula neuronală postsinaptică printr-un canal asociat cu receptorii. Pe lângă aceasta, acești receptori se consideră că sunt implicați în potențarea pe termen lung și în afecțiunile sistemului nervos central.
- 40

Proprietățile citotoxice ale spiro-pirolidinelor nu au fost niciodată dezvăluite. Mai mult decât atât, integrarea unității de spiro-pirolidină fuzionată în cadrul produselor naturale disponibile reprezintă o cale convenabilă spre noi entități chimice cu activități biologice promițătoare. În particular, utilizarea diterpenoidelor *ent*-kauranice în calitate de substraturi accesibile pentru conjugatele hibride terpenic-heterociclice este în mod deosebit de convenabilă. Țesutul vegetal de floarea-soarelui (*Helianthus Annuus*), reprezintă în prezent deșeuri după recoltare, conține o cantitate mare de acid *ent*-kaurenoic (**1**) care poate fi obținut în cantități preparative.

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 citotoxicitate puternică împotriva mai multor linii de celule canceroase (HL60- leucemie, A549 –pulmonare, AZ521 – stomac, SK-BR-3 – glande mamare) cu valori micromolare ale IC₅₀ de 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 izosteviol (**4**). Spre deosebire de alcoolul (**3**), compusul regrupat (**4**) a fost subiectul unor modificări chimice care a condus la obținerea mai multor substanțe cu proprietăți terapeutice relevante, inclusiv apoptotice [2], citotoxice [3, 4] și acțiuni antiproliferative [5]. Puține date sunt disponibile cu privire la factorul de selectivitate [6] al acestor derivați cunoscuți.

Transformările chimice ale acidului *ent*-kaurenoic (**1**) s-au efectuat în două direcții: modificarea grupei carboxil 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 IC₅₀ = 0,52 M [7].

S-au observat puține date despre introducerea azotului 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 unele brevete. Singurul exemplu de heterociclu cu azot spiro-fuzionat din seria *ent*-kauranică a fost raportat recent și reprezintă o pirazolină (**5**) cu proprietăți antiinflamatoare foarte slabe [8].

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 (**6**), în care legătura dublă exometilenică a fost supusă reacției de hidroaminare formând derivați cu azot, inclusiv cu heterocicli ca 2-pirolidona [9]. Pentru unul din compușii revendicați au fost prezentate datele citotoxicității *in vitro* care demonstrează o activitate bună 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 (**6**), 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.

Cel mai recent exemplu de derivați citotoxici *ent*-kauranici de origine naturală este compusul flexicaulina A (**7**) (Hongjie Z. and Handong S. Diterpenoids from *Rabdosia flexicaulis*. Phytochemistry, 1989, 28(12), pp.3534-3536). S-a dovedit că acest compus posedă citotoxicitate împotriva celulelor carcinomului de colon într-un mod selectiv, arătând o toxicitate minimă la animale [10]. S-a raportat sinteza Pseudoirroratinei A (**8**), care este de asemenea un compus natural, de rand cu citotoxicitatea sa împotriva unei serii de linii de celule canceroase [10, 11]. Citotoxicitatea unei serii de derivați sintetici a flexicaulinei A (**7**) a fost raportată într-un brevet recent [12]. Dezavantajele acestei invenții constau în faptul că, precursorul natural (**7**) 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 (**7**) dezvăluit în [12]. Niciunul dintre compușii dezvăluit nu conține grupe funcționale spiro-2-pirolidinic, iar activitatea citotoxică este demonstrată pe un număr restrâns de tipuri de cancer, care nu include leucemia sau cancerul pulmonar.

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 compusul revendicat (**9**) care include un heterociclu spiro-pirolidinic adițional, atașat la scheletul carbonic diterpenic și datorită acestei grupe funcționale posedă citotoxicitate față de celulele tumorale maligne.

Rezultatul invenției include sinteza chimică a compusului spiro-pirolidinic (**9**) cu schelet al *ent*-kauranului care a demonstrat o activitate citotoxică selectivă față de celulele tumorale Hap-1 (leucemie mieloidă cronică), DND-41 (leucemie limfoblastică acută), HL-60 (leucemie mieloidă acută), K-562 (leucemie mieloidă cronică), NCI-H460 (carcinom pulmonar) și Z-138 (limfom non-Hodgkin).

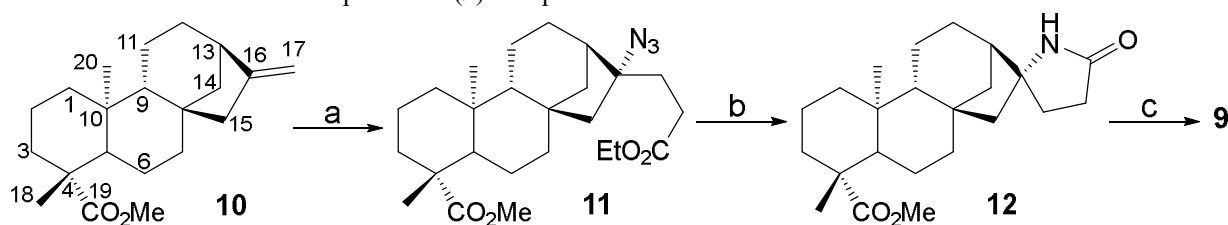
Rezultatul invenției este cauzat de descoperirea faptului că, modificarea chimică a acidului *ent*-kaurenoic (**1**) natural, care cuprinde metilarea grupei carboxilice și includerea unui ciclu pirolidinic în poziția C-16 a scheletului carbonic tetraciclic determină activitatea citotoxică selectivă revendicată la un nivel micromolar al valorilor IC₅₀.

Avantajele compusului revendicat sunt structura chimică bazată pe un compus natural diterpenic, o procedură sintetică relativ simplă cu o succesiune scurtă de etape, disponibilitatea nelimitată a materiei prime din resursele vegetale regenerabile, care reprezintă o cultură industrială dominantă în zona europeană. Avantajul cel mai relevant este activitatea citotoxică și un indice de selectivitate ridicat pentru liniile de celule tumorale Hap-1 (leucemie mieloidă cronică), DND-41 (leucemie limfoblastică acută), HL-60 (leucemie mieloidă acută), K-562 (leucemie mieloidă cronică), NCI-H460 (carcinom pulmonar) și Z-138 (limfom non-Hodgkin).

Asamblarea arhitecturii moleculare hibride a compusului revendicat poate fi realizată prin diferite metode de sinteză, cel mai convenabil printr-o secvență în trei etape pornind de la *ent*-kaurenoatul de metil (**10**) cunoscut. Etapa cheie a acestei secvențe este o reacție de carboazidare mediată de radicali liberi, urmată de hidrogenare, lactamizare simultană și reducere a lactamei corespunzătoare până la fragmentul de pirolidină.

Investigarea profilului de activitate biologică a pirolidinei (**9**) 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 IC₅₀ pentru celulele normale/IC₅₀ pentru celulele tumorale corespunzătoare [6], sunt mai mari decât valoarea pragului de 3. Cel mai similar compus din seria *ent*-kauranică, pirazolina (**5**) nu a demonstrat careva citotoxicitate.

Materia primă pentru obținerea compusului (**9**) a fost reziduul vegetal al recoltei de floarea-soarelui, din care a fost extras acidul *ent*-kaurenoic (**1**) și metilat până la esterul (**10**) (Moraescu 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). Următoarele transformări care conduc la pirolidina (**9**) sunt prezentate în schemă.



Schemă. Reagenți și condiții: a) ICH₂CO₂Et, PhSO₂N₃, Et₃B, EtOH, t.c., 2 ore; (b) 1 atm. H₂, 10% Pd/C, EtOAc, t.c., 48 ore; (c) NaBH₄, I₂, THF, reflux, 8 ore.

Carboazidarea esterului (**10**) până la azidă (**11**) a fost realizată cu iodoacetatul de etil în prezența unui exces mic de fenilsulfonilazidă ca sursă de azidă. Pentru inițierea radicalică s-a folosit trietilboranul obținându-se rezultate bune. Prima etapă de reducere a azidei (**11**) a fost realizată prin reacția de hidrogenare mediată de paladiu pe cărbune. Lactama (**12**) a fost izolată și supusă celei de-a doua reduceri, folosind boranul generat *in situ* (sistemul NaBH₄-I₂). Structura pirolidinei rezultante (**9**) a fost demonstrată fără echivoc pe baza datelor spectrale (RMN, IR, MS). Spectrele IR și RMN ale pirolidinei (**9**) sunt prezentate în figurile 1-3. Stereochimia absolută la centrul chiral C-16 nou format a fost confirmată indirect prin analiza X-ray (fig. 4) a unui monocristal al lactamei precursoră (**12**).

Evaluarea activității citotoxice a pirolidinei (**9**) 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.

Nivelurile de activitate ale compusului (**9**) sunt mult mai mari decât ale medicamentului de referință Cisplatin (IC₅₀ 16,5 pentru HCT-116 și 5,33 pentru NCI-H460) și comparabile cu medicamentul comercializat în prezent Midostaurina (IC₅₀ 0,237 pentru HCT-116 și 0,43 pentru NCI-H460, date prezentate de institutul Sanger: <https://www.cancerrxgene.org>).

Acțiunea selectivă a pirolidinei (**9**) a fost demonstrată prin teste *in vitro* care au fost efectuate pe celule de retină necanceroase (hTERT RPE-1), iar rezultatele IC₅₀ au arătat valori mai mari decât pentru

celulele tumorale selectate. Indicii de selectivitate (SI) sunt date de IC₅₀ pentru celulele normale/IC₅₀ pentru celulele tumorale corespunzătoare [6]. Valorile relevante sunt date în tabel.

Tabel

Activitatea antiproliferativă a pirolidinei (9)

Compus	Conc. unit	IC ₅₀								
		hTERT RPE-1	Capan-1	Hap-1	HCT-116	NCI-H460	DND-41	HL-60	K-562	Z-138
9	μM	32,2±2,0	11,5±1,0	9,2±3,3 SI=3,5	11,6±0,5	1,0±0,1 SI=32,2	6,1±1,1 SI=5,3	8,3±1,3 SI=3,9	3,2±1,0 SI=10,1	9,5±0,9 3,4
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

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

Pirolidina (**9**) revendicată este un compus stabil în aer și la umiditate, solubil în DMSO și alți solvenți organici.

Lista figurilor

10 Figurile prezentate mai jos sunt date pentru a demonstra structura atribuită compusului revendicat, care este o nouă entitate chimică:

- fig. 1, spectrul IR al pirolidinei (**9**);
- fig. 2, spectrul ¹H RMN al pirolidinei (**9**);
- fig. 3, spectrul ¹³C RMN al pirolidinei (**9**);
- fig. 4, structura moleculară a lactamei (**12**) realizată în baza analizei cu raze X.

15

Exemple de realizare a invenției

Sinteza pirolidinei (**9**)

O soluție de Et₃B (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 (**10**) (50 mg, 0,16 mmol) și PhSO₂N₃ (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 Et₃B 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 extracție cu Et₂O (2 x 15 ml). Fazele organice combinate se usucă pe Na₂SO₄, se filtrează și se evaporă solventul sub presiune redusă. Produsul brut se purifică prin cromatografie pe coloană (hexan/EtOAc) obținându-se azida (**11**) (43 mg, 60%). Lichid vascos incolor. $[\alpha]_D^{20} = -79.50$ (c=0.84, CHCl₃). IR (ν, cm⁻¹): 2944, 2873, 2096, 1727, 1502. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 4.12 (q, J = 7.2 Hz, -CO₂CH₂CH₃), 3.62 (s, -CO₂CH₃), 2.42 (t, J = 7.9 Hz, -CH₂-COOEt), 1.25 (t, J = 7.2 Hz, -CO₂CH₂CH₃), 1.14 (s, CH₃-20), 0.80 (s, CH₃-22). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C: 177.90 (s, C-21), 173.38 (s, C-19), 73.07 (s, C-16), 60.54 (t, -CO₂CH₂CH₃), 56.72 (d, C-5), 55.80 (d, C-9), 51.51 (t, C-15), 51.13 (q, -CO₂CH₃), 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, -CO₂CH₂CH₃). GCMS m/z calculat pentru [C₂₅H₃₉N₃O₄]: 445.28; găsit: 402.3 (M-HN₃).

O soluție de azidă (**11**) (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 H₂ (1 atm). Catalizatorul a fost filtrat, solventul a fost evaporat la presiune redusă și produsul brut a fost purificat prin cromatografie pe coloană (CH₂Cl₂/MeOH 90:10), obținându-se lactama (**12**) (42 mg, 95%) sub formă de pulbere albă. T.t. 150-152 °C, $[\alpha]_D^{20} = -77.37$ (c 4.50, CHCl₃). IR (ν, cm⁻¹): 3676, 3209, 2937, 2298, 1712, 1683. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 6.68 (s, -NH), 3.63 (s, -CO₂CH₃), 2.30 (m, CH₂-17), 2.05 (d, J = 11.9 Hz, CH₂-18), 1.15 (s, CH₃-20), 0.81 (s, CH₃-22). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) 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.

40 La o soluție de borohidruură de sodiu (20,3 mg, 0,536 mmol) și I₂ (102,1 mg, 0,402 mmol) în 4 ml THF s-a adăugat lactama (**12**) (50 mg, 0,134 mmol). Amestecul de reacție a fost refluxat timp de 8 ore

(control CSS). La consumul total a materiei prime, amestecul de reacție a fost răcit la 0 °C, excesul de borohidru a fost distrus cu soluție de 3N HCl, apoi neutralizat cu soluție de 3N NaOH. Faza apoasă a fost extrasă cu eter dietilic (3 x 15 ml). Frațiile organice combinate au fost spălate cu soluție saturată de tiosulfat de sodiu, apoi cu soluție saturată de NaCl și, în final, uscată pe sulfat de sodiu anhidru. Filtrarea și evaporarea solventului la presiune redusă au dat produsul brut, care a fost separat la cromatografie pe coloană (CH₂Cl₂/MeOH), obținându-se pirolidina (**9**) (40,8 mg, 0,114 mmol, 85%). (16R)-spiro[pirolidin-2?,16-*ent*-17-norkauran]-19-oatul de metil (**9**): $[\alpha]_D^{20} = -73.56$ (c 2.74, CHCl₃). IR, (ν, cm⁻¹): 3424, 2940, 2871, 2744, 2483, 1722, 1599. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 0.78-1.81 (t, 2H, H-1), 1.42 (m, 2H, H-2), 0.97-2.16 (t, 2H, H-3), 1.02 (t, 1H, H-5), 1.74-1.86 (q, 2H, H-6), 1.40- 2.03 (t, 2H, H-7), 0.98 (t, 1H, H-9), 1.63 (q, 2H, H-11), 1.85 (q, 2H, H-12), 2.65 (m, 1H, H-13), 1.61 (d, 2H, H-14), 1.55-2.19 (s, 2H, H-15), 2.09 (t, 2H, H-17), 1.15 (s, 3H, H-18), 0.82 (s, 3H, H-20), 2.08 (m, 2H, H-21), 3.42 (t, 2H, H-22), 3.63 (s, 3H, H-23). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ_C: 40.70 (CH₂, C-1), 19.05 (CH₂, C-2), 38.07 (CH₂, C-3), 43.81 (Cq, C-4), 56.72 (CH, C-5), 22.07 (CH₂, C-6), 40.26 (CH₂, C-7), 45.70 (Cq, C-8), 55.68 (CH, C-9), 39.49 (Cq, C-10), 18.64 (CH₂, C-11), 38.54 (CH₂, C-12), 43.33 (CH, C-13), 26.88 (CH₂, C-14), 52.42 (CH₂, C-15), 76.85 (Cq, C-16), 32.96 (CH₂, C-17), 28.60 (CH₃, C-18), 177.87 (Cq, C-19), 15.33 (CH₃, C-20), 22.69 (CH₂, C-21), 42.73 (Cq, C-22), 51.11 (CH₃, C-23).

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 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.

Citotoxicitatea compusului revendicat (**9**) 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 x 10⁻³ 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 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.

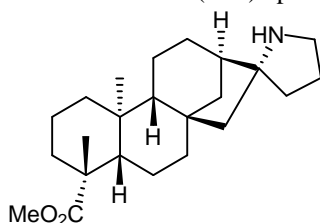
(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

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. Hueso-Falcon I., Giron N., Velasco P., Amaro-Luis J.M., Ravelo A.G., de las Heras B., Hortelano S. and Estevez-Braun A. Synthesis and induction of apoptosis signaling pathway of ent-kaurane derivatives. *Bioorganic & Medicinal chemistry*, 2010, 18(4), pp.1724-1735.
9. US 10196344 B2 2019.02.05
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?,16-ent-17-norkauran]-19-oic cu formula:



2. Ester metilic al acidului (16R)-spiro[pirolidin-2?,16-ent-17-norkauran]-19-oic, conform revendicării 1, pentru utilizare în calitate de inhibitor selectiv al proliferării celulelor tumorale selectate din grupul care cuprinde liniile Hap-1 și K-562 ale leucemiei mieloide cronice, NCI-H460 a carcinomului pulmonar, DND-41 a leucemiei limfoblastice acute, HL-60 a leucemiei mieloide acute și Z-138 a limfomului non-Hodgkin.

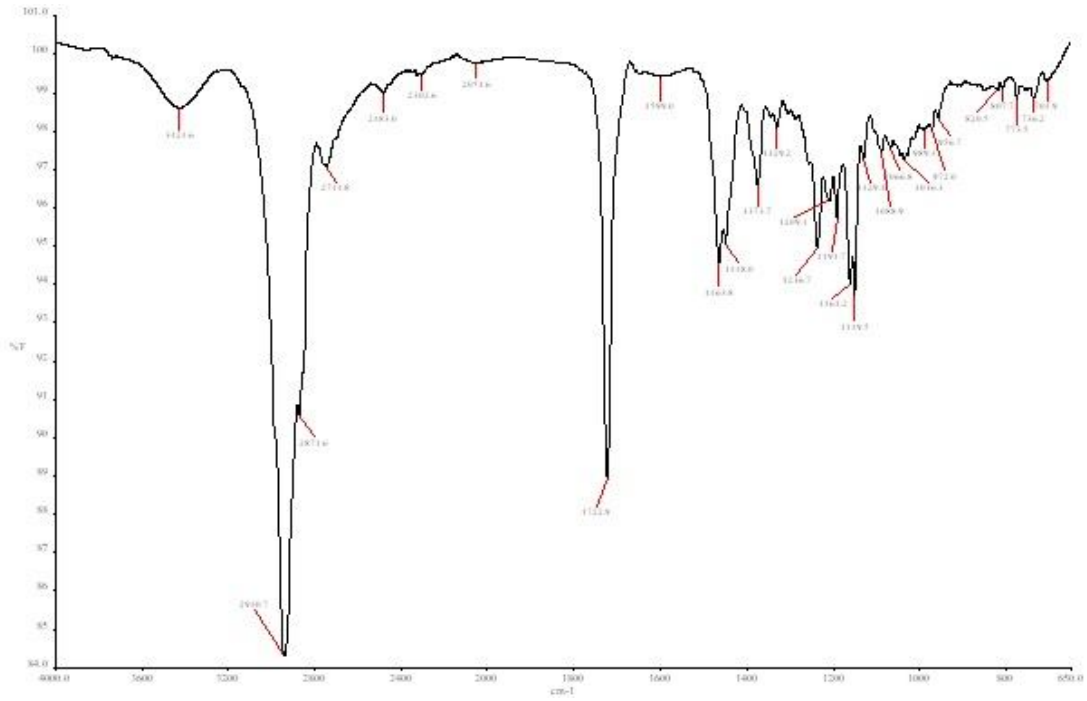


Fig. 1

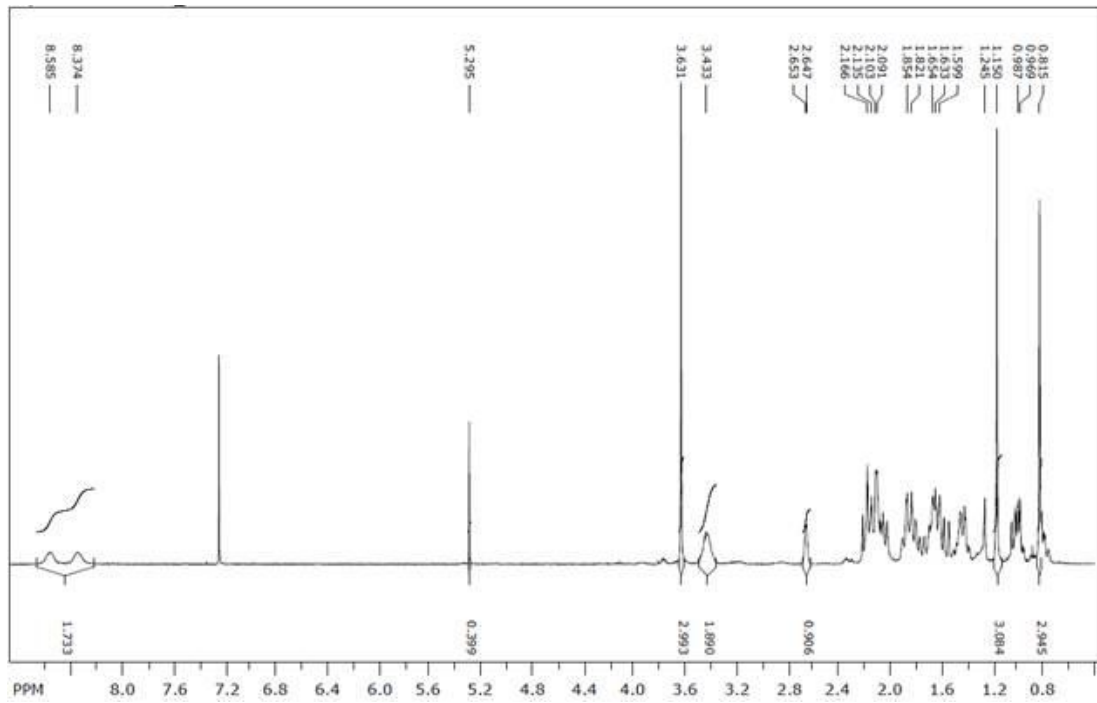


Fig. 2

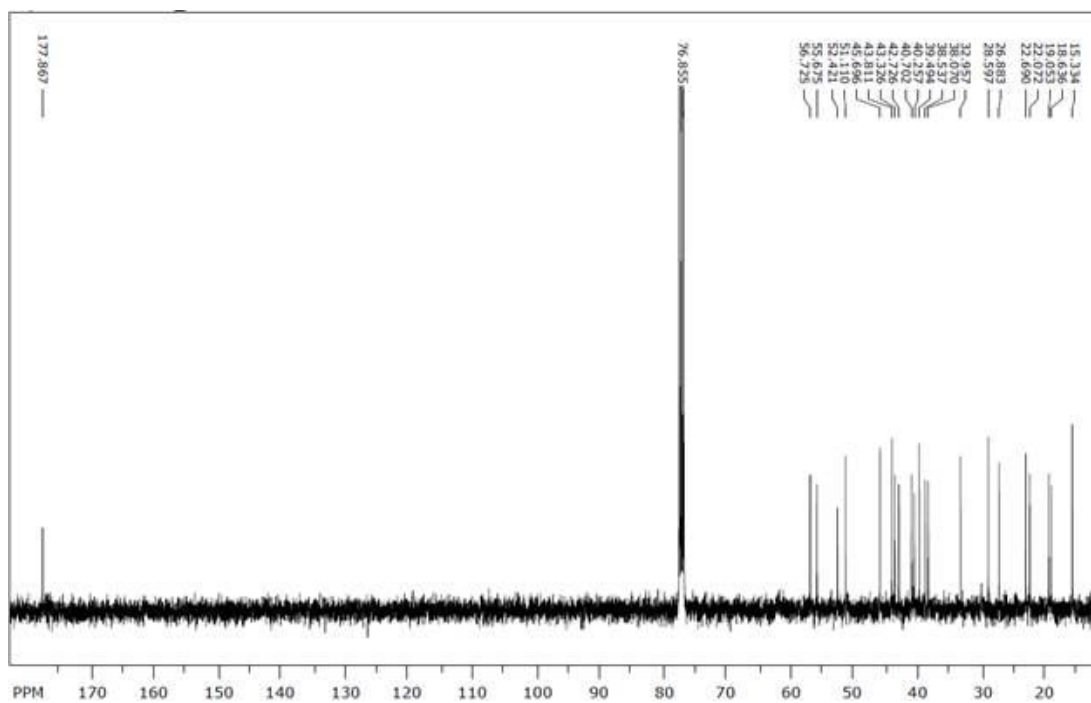


Fig. 3



Fig. 4