



MD 4805 C1 2022.12.31

## REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4805** (13) **C1**  
(51) Int.Cl: *A61K 31/015* (2006.01)  
*A61K 31/655* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*C07C 247/14* (2006.01)  
*C07C 61/08* (2006.01)

## (12) BREVET DE INVENȚIE

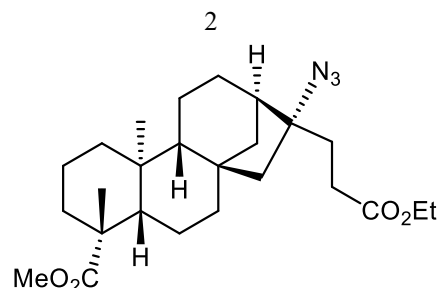
<p>(21) Nr. depozit: a 2021 0058 (22) Data depozit: 2020.03.12</p> <p>(41) Data publicării cererii: 2021.12.31, BOPI nr. 12/2021</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2022.05.31, BOPI nr. 5/2022</p> <p>(62) Divizată din cererea: Nr.: a 2020 0022 Data: 2020.03.12</p>
<p>(71) 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) Utilizarea metil *ent*-16-azido-17-carboxietoximetilkauranoatului în calitate de inhibitor selectiv al proliferării limfomului non-Hodgkin

## (57) Rezumat:

Invenția se referă la chimia compușilor naturali și chimia medicinală, în special la utilizarea în calitate de agent chimioterapeutic, pentru tratamentul afecțiunilor oncologice, a unui derivat al acidului *ent*-kaurenoic ce conține o grupă funcțională azidă.

Conform invenției, se revendică utilizarea metil *ent*-16-azido-17-carboxietoximetilkauranoatului cu formula



în calitate de compus citotoxic selectiv, pentru care s-a demonstrat inhibarea selectivă a proliferării liniei de celule tumorale Z-138 (limfom non-Hodgkin) la o valoare a IC<sub>50</sub> egală cu 0,5 μg/mL.

Revendicări: 1

Figuri: 3

MD 4805 C1 2022.12.31

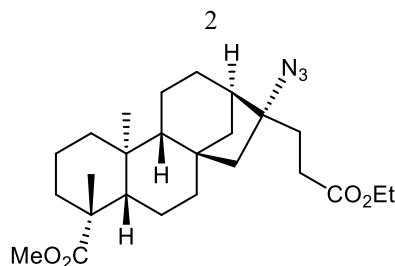
**(54) Use of methyl *ent*-16-azido-17-carboxyethoxymethylkauranoate as selective non-Hodgkin lymphoma proliferation inhibitor**

**(57) Abstract:**

1

The invention relates to the chemistry of natural compounds and medicinal chemistry, in particular to the use of an *ent*-kaurenoic acid derivative containing an azide functional group as a chemotherapeutic agent for the treatment of oncological diseases.

According to the invention, claimed is the use of methyl *ent*-16-azido-17-carboxyethoxymethylkauranoate with the formula



as selective cytotoxic compound, for which selective inhibition of Z-138 tumor cell line (non-Hodgkin lymphoma) proliferation has been demonstrated at an  $IC_{50}$  value equal to 0.5  $\mu\text{g/mL}$ .

Claims: 1

Fig.: 3

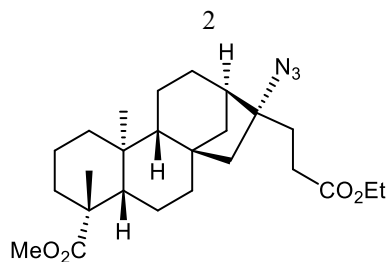
**(54) Применение метил *энт*-16-азидо-17-карбоксииэтоксиметилкаураноата в качестве селективного ингибитора пролиферации неходжкинской лимфомы**

**(57) Реферат:**

1

Изобретение относится к химии природных соединений и медицинской химии, в частности к применению в качестве химиотерапевтического агента, для лечения онкологических заболеваний, производного *энт*-кауреновой кислоты содержащего азидную функциональную группу.

Согласно изобретению, заявлено применение метил *энт*-16-азидо-17-карбоксииэтоксиметилкаураноата с формулой



в качестве селективного цитотоксического вещества, для которого было доказано селективное ингибирование пролиферации линии раковых клеток Z-138 (неходжкинская лимфома) при значении  $IC_{50}$  равному 0,5 мкг/мл.

П. формулы: 1

Фиг.: 3

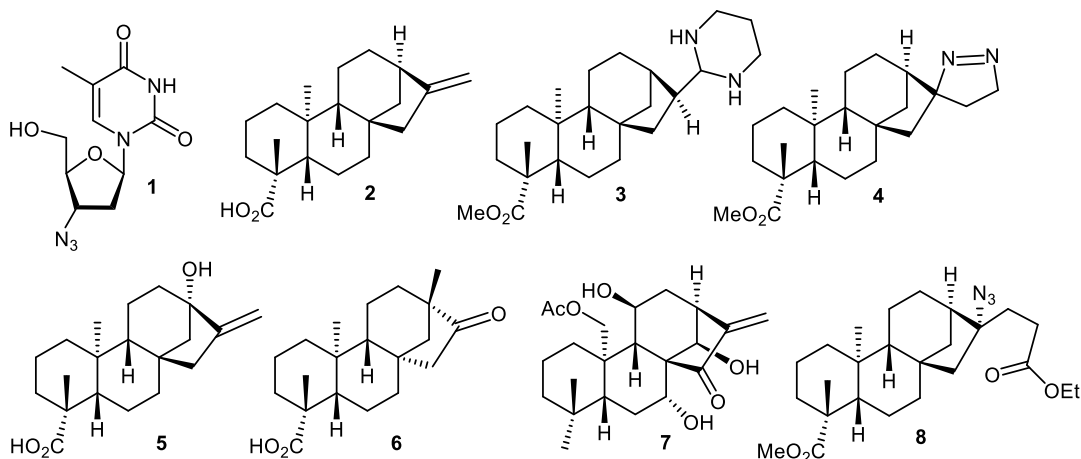
**Descriere:****(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)**

5 Invenția se referă la chimia compușilor naturali și chimia medicinală, în special la utilizarea în calitate de agent chimioterapeutic pentru tratarea maladiilor canceroase a unui derivat al acidului *ent*-kaurenoic ce reprezintă scheletul carbonic diterpenic extins, funcționalizat suplimentar cu o grupă azidă terțiară și carboxil.

10 Grupele funcționale azide, necătând la caracterul lor aparent ne-natural, sunt din ce în ce mai utilizate în studiile chimiei medicinale. În afară de utilizarea lor în reacțiile “click”, care reprezintă 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.

30 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, utilizarea diterpenoidelor *ent*-kauranice în calitate de schelete disponibile pentru încorporarea grupei azide este convenabilă. Țesutul vegetal de floarea-soarelui (*Helianthus Annuus*), componentul principal al deșeurilor după recoltare, conține o cantitate mare de acid *ent*-kaurenoic (**2**) care poate fi obținut 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., 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). Din câte se cunoaște, la compușii *ent*-kauranici cu grupe funcționale azide nu a fost raportată până în prezent activitatea citotoxică.

40 Anterior, derivatizarea acidului *ent*-kaurenoic (**2**) s-a 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), p. 9-19). Au fost observate puține date privind introducerea atomului de azot în scheletul carbonic al kauranilor. Totuși, grupele funcționale heteroatomice în bază de azot sunt farmacofori relevanți în diterpenoidele biologice active și exemplele  
45 similare pot fi găsite în literatura de specialitate.



De exemplu, derivatul diterpenic perhidropirimidinic (**3**) aferent structurii *ent*-kauranice are o citotoxicitate foarte modestă împotriva liniilor de celule canceroase [1]. O pirazolină similară (**4**) 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  $IC_{50} = 0,52$  M [3]. Puțin se cunoaște despre indicele de selectivitate ale compușilor activi, la o comparație a 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 (**5**) 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  $IC_{50}$  cu o singură cifră. E de menționat însă 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 (**5**), rezultând o conversie cantitativă la așa-numitul izo-steviol (**6**). Spre deosebire de alcoolul (**5**), compusul regrupat (**6**) 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 (**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]. Citotoxicitatea unei serii de derivați sintetici cu scheletul flexicaulinei A (**7**) a fost dezvăluită într-un brevet recent [11]. 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**) dezvăluiti în brevet [11]. Niciunul dintre aceștia nu include grupe funcționale azide.

Problema soluționată de invenția dată constă în identificarea unui derivat al compusului diterpenic natural abundent acidul *ent*-kaurenoic (**2**), care manifestă o activitate citotoxică selectivă împotriva celulelor tumorale maligne.

Soluția pentru această problemă este oferită de derivatul (**8**) cu structură *ent*-kauranică ce conține grupa azidă integrată în scheletul extins al acidului *ent*-kaurenoic (**2**) natural: metil *ent*-16-azido-17-carboxietoximetilkauranoat.

Rezultatul invenției constă în selectarea azidei (**8**) cu o activitate citotoxică înaltă și selectivă față de celulele tumorale Z-138 (limfom non-Hodgkin).

Rezultatul invenției este cauzat de descoperirea faptului că, incorporarea unei azide la atomul de carbon terțiar în compusul natural (**2**), împreună cu esterificarea grupei carboxilice și extinderea catenei laterale, determină o activitate citotoxică selectivă.

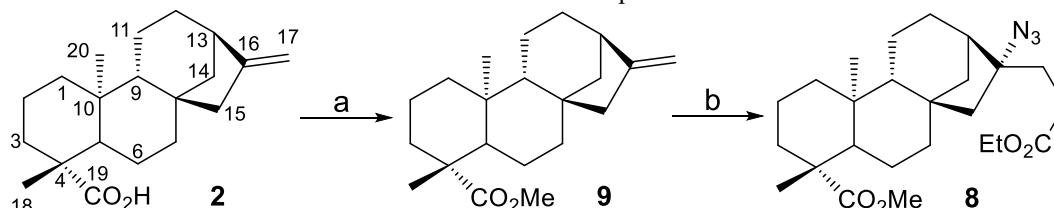
Investigarea profilului de activitate biologică a azidei (**8**) a arătat o citotoxicitate relevantă împotriva mai multor linii celulare tumorale și pentru majoritatea acestora o citotoxicitate mai mică față

de celulele normale de retină (hTERT RPE-1). În particular, compusul (**8**) arată o valoare  $IC_{50}$  pentru linia de celule Z-138 (limfom non-Hodgkin) egală cu  $0,5 \mu\text{g/mL}$ . Indicele de selectivitate (SI), exprimat prin raportul valorilor  $IC_{50}$  pentru celulele normale și respectiv pentru celulele tumorale corespunzătoare [4], este egal cu 3,6. Aceasta atestă un potențial sporit pentru aplicarea terapeutică a compusului (**8**).

5 Compusul propus (**8**) are schelet carbonic asemănător cu al *ent*-kaurenoatului de metil (**9**) cunoscut, având doi atomi de carbon suplimentari care formează o catenă laterală carboxietilică în poziția C-17, de rând cu o grupă azidă terțiară la atomul de carbon C-16. Compusul (**8**) poate fi obținut prin  
10 modificarea chimică a *ent*-kaurenoatului de metil (**9**), disponibil la rândul lui la metilarea acidului *ent*-kaurenoic natural (**2**) (Morarescu O. et al. Study on extraction process of sunflower (*Helianthus Annuus* L.) dry wastes using different solvents. Chem. J. Moldova, 2013, 8, p. 90-93; Grinco M. et al. C15  
15 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). Conversia esterului (**9**) în azida țintă se realizează cu iodoacetatul de etil într-o singură etapă mediată de radicali liberi și a fost dezvăluită preliminar în rezumatul unei comunicări (Gîrbu V., Grinco M., Ungur N., Kulcički V., Renaud P.  
20 Generating diversity in natural product scaffolds. Synthesis of *ent*-kauranic derivatives functionalized with triazole fragments. International symposium “Medicinal plants. Present and perspectives”, september 6-9, 2016, Piatra Neamt, Romania. Abstracts of communication, pp.88-89).

Avantajele compusului (**8**) sunt structura chimică bazată pe un compus natural diterpenic ușor  
20 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 (**8**) este reziduu vegeta  
25 l de la recolta de floarea soarelui, din care este extras acidul *ent*-kaurenoic (**2**) (Morarescu O. et al. Study on extraction process of sunflower (*Helianthus Annuus* L.) dry wastes using different solvents. Chem. J. Moldova, 2013, 8, p. 90-93; Grinco M. et al. 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 puternică și indicele de selectivitate ridicat pentru linia de celule tumorale Z-138 (limfom non-Hodgkin).

Transformările ce demonstrează sinteza azidei **8** sunt prezentate în schemă.



30 **Schemă.** Reagenți și condiții: a)  $\text{CH}_2\text{N}_2$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ , 0,5 ore; (b)  $\text{ICH}_2\text{CO}_2\text{Et}$ ,  $\text{PhSO}_2\text{N}_3$ ,  $\text{Et}_3\text{B}$ ,  $\text{EtOH}$ , t. c.,  $\text{O}_2$ , 2 ore.

Azida individuală (**8**) a fost izolată și purificată prin cromatografie pe coloană pe silicagel. Structura ei a fost demonstrată fără echivoc în baza datelor spectrale (RMN, IR, MS). Spectrele IR și RMN sunt prezentate în figurile 1-3.

35 Evaluarea activității citotoxice a azidei (**8**) 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 (**8**).

Compusul studiat	Conc. unit	$IC_{50}$								
		hTERT RPE-1	Capan-1	Hap-1	HCT -116	NCI-H460	DND-41	HL-60	K-562	Z-138
<b>8</b>	$\mu\text{M}$	$1,8 \pm 0,4$	$1,7 \pm 0,5$	$4,4 \pm 2,7$	$1,0 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,3$	$3,0 \pm 1,4$	$8,8 \pm 2,2$	$0,5 \pm 0,2$ SI=3,6
<b>DT</b>	nM	$18,7 \pm 4,8$	$4,2 \pm 1,8$	$4,5 \pm 1,5$	$2,2 \pm 0,8$	$5,5 \pm 1,3$	$4,7 \pm 1,2$	$4,3 \pm 1,6$	$5,2 \pm 1,2$	$3,7 \pm 0,7$
<b>SP</b>	nM	1,0	$6,2 \pm 1,8$	$1,3 \pm 0,2$	1,5	$2,2 \pm 0,8$	$8,6 \pm 1,5$	$9,1 \pm 1,6$	$27,9 \pm 3,2$	$6,7 \pm 4,4$

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

Nivelul de activitate a compusului (**8**) este mult mai mare decât al medicamentului de referință Cisplatina (IC<sub>50</sub> 5,33 pentru NCI-H460, date ale Institutului Sanger: <https://www.cancerrxgene.org>), iar activitatea citotoxică față de linia de celule tumorale Z-138 (limfom non-Hodgkin) este o proprietate care nu a fost demonstrată în soluția cea mai apropiată a invenției [11].

5 Acțiunea selectivă a azidei (**8**) a fost demonstrată prin comparația rezultatelor testelor *in vitro* efectuate pe celule de retină necanceroase (hTERT RPE-1) cu cele efectuate pe celulele tumorale.

Azida (**8**) este un compus stabil în aer și la umiditate, solubil în DMSO și alți solvenți organici.

Invenția este explicată în continuare prin figurile prezentate mai jos pentru a demonstra structura atribuită a compusului studiat.

10 Figurile desenelor reprezintă:

- fig. 1, spectrul IR al azidei (**8**);

- fig. 2, spectrul <sup>1</sup>H RMN al azidei (**8**);

- fig. 3, spectrul <sup>13</sup>C RMN al azidei (**8**).

## 15 Exemple de realizare a invenției

### Sinteza azidei (**8**)

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 (**9**) (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 extracție 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 la presiune redusă. Produsul brut se purifică prin cromatografie pe coloană

(hexan/EtOAc) obținându-se azida (**8**) (43 mg, 60%). Lichid vâcos 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 RMN (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 RMN (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>).

### Testele de citotoxicitate in vitro

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

45 Citotoxicitatea compusului (**8**) 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<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 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.

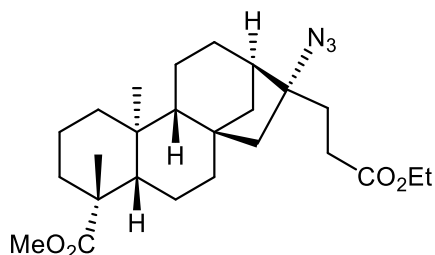
55

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

1. Batista R., Garcia P.A., Castro M.A., del Corral J.M.M., Speziali N.L., Varotti F.D.P., de Paula R.C., Garcia-Fernandez L.F., Francesch A., San Feliciano A. and de Oliveira A.B. Synthesis, cytotoxicity and antiplasmodial activity of novel ent-kaurane derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 62, pp.168-176.
2. Costa-Lotufo L.V., Cunha G.M.A., Farias P.A.M., Viana G.S.B., Cunha K.M.A., Pessoa C., Moraes M.O., Silveira E.R., Gramosa N.V. and Rao V.S.N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. *Toxicon*, 2002, 40(8), pp.1231-1234.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Khaybullin R.N., Zhang M., Fu J., Liang X., Li T., Katritzky A.R., Okunieff P. and Qi X. Design and synthesis of isosteviol triazole conjugates for cancer therapy. *Molecules*, 2014, 19(11), pp. 18676-18689.
9. 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.
10. 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.
11. US 10493056 B2 2019.12.03

**(57) Revendicări:**

Metil *ent*-16-azido-17-carboxietoximetilkauranoat cu formula



pentru utilizare în calitate de inhibitor selectiv al proliferării liniei de celule tumorale Z-138 a limfomului non-Hodgkin.

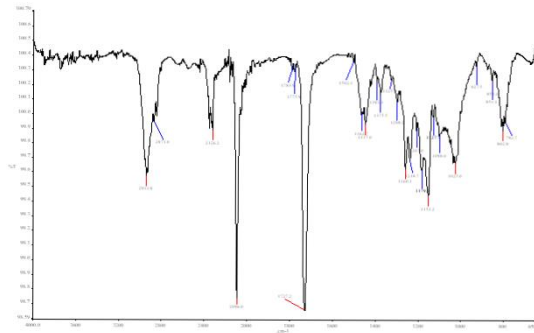


Fig. 1

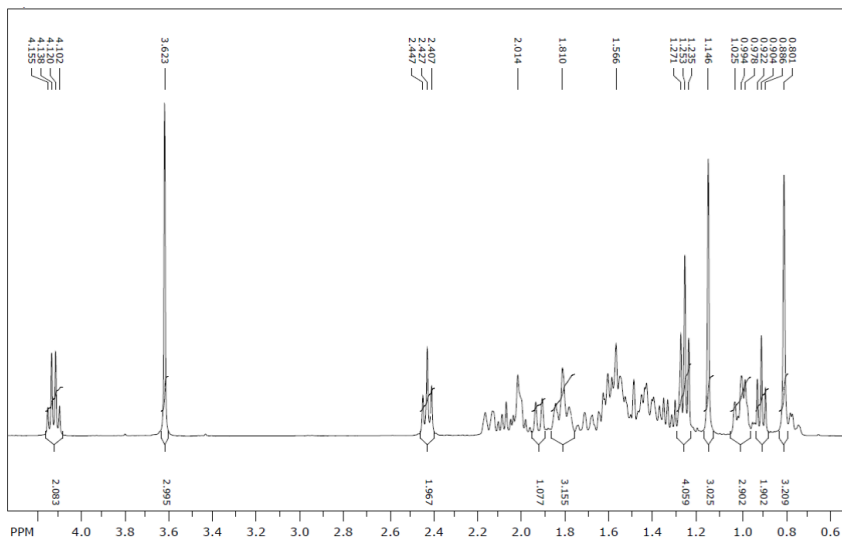


Fig. 2



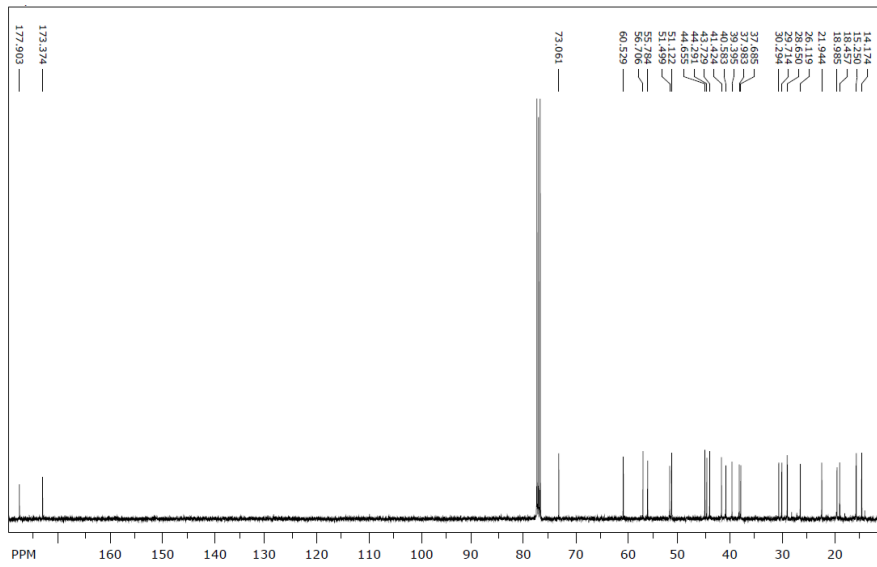


Fig. 3