



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 01255

(22) Data de depozit: 30.11.2010

(41) Data publicării cererii:  
30.08.2011 BOPI nr. 8/2011

(71) Solicitant:  
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI  
FARMACIE "CAROL DAVILA" DIN  
BUCUREȘTI, STR. DIONISIE LUPU NR. 37,  
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• UIVAROȘI VALENTINA,  
BD. ALEXANDRU OBREGIA NR. 31, BL. 15,  
SC. 2, AP. 49, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,  
RO;

• GRUIA MARIA-IULIANA, BD. BASARABIA  
NR. 244, BL. MY8, AP. 19, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• VELESCU BRUNO ȘTEFAN,  
STR. NEAGOE VODĂ NR. 53, BACĂU, BC,  
RO;  
• ALDEA VICTORIA, CALEA MOȘILOR  
NR. 205, BL. 11, SC. A, ET. 6, AP. 22,  
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;  
• BADEA ELENA MIHAELA,  
STR. CRINUL DE PĂDURE NR. 1, BL. B67,  
SC. 1, AP. 73, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,  
RO

(54) COMPUȘI DE RUTENIU CU ACȚIUNE ANTITUMORALĂ ȘI  
PROCEDEU DE SINTEZĂ

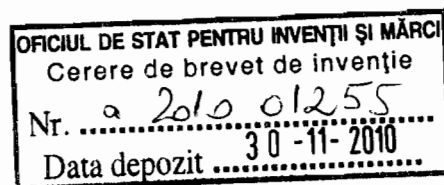
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un compus de ruteniu și la un procedeu pentru prepararea acestuia, utilizat ca agent antitumoral. Compusul conform invenției are formula generală:  $[RuCl_3(DMSO)(L_2)]_x \cdot mDMSO \cdot nH_2O$ , în care L este un ligand chinolonic selectat dintre acid pipemic (pip), enoxacină (enx), norfloxacină (nf), ciprofloxacina (cp), enrofloxacină (enro), ofloxacină (of) sau levofloxacină (levof), și valorile m și n diferă în funcție de ligandul L. Procedeu conform invenției constă din dizolvarea ligandului chinolonic în dimetilsulfoxid,

prin adăugarea de  $RuCl_3$  anhidră sau o cantitate corespunzătoare de sare hidratată, astfel încât raportul ion metalic: ligand: solvent să fie 1:2:42, după care amestecul rezultat se agită și se încălzește convențional sau la microunde, apoi proba se răcește, se tratează cu o soluție 2M de clorură de sodiu, rezultând un precipitat brun, care se filtrează, se spală și se usucă.

Revendicări: 12



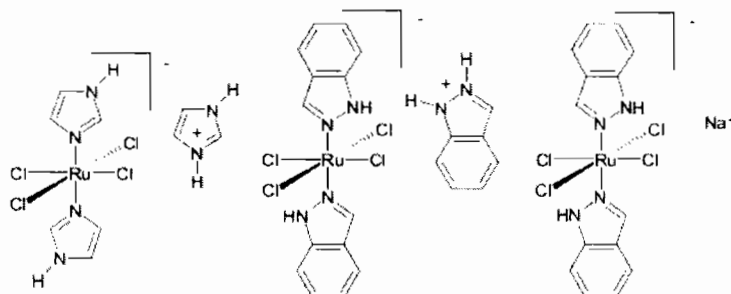


## COMPUȘI DE RUTENIU CU ACȚIUNE ANTITUMORALĂ ȘI PROCEDEU DE SINTEZĂ

Invenția se referă la compuși de ruteniu(III) cu chinolone și dimetilsulfoxid, la sinteză și la utilizarea acestora pentru acțiunea antitumorală.

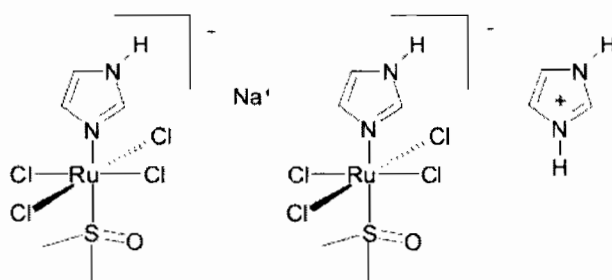
În prezent, cele mai utilizate antitumorale pe bază de complecși metalici sunt derivații platinei(II) cisplatin și analogii sai carboplatin și oxaliplatin. Rezistența tumorilor la medicament și efectele adverse au limitat însă utilizarea lor clinică (Kartalou, M.; Essigmann, J. M., Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat. Res.* 2001, 478, 23-43; Hill, J.M., Speer, R.J., Organo-platinum complexes as antitumor agents. *Anticancer Res.* 1982, 2,173–86). Aceste limitări au determinat orientarea cercetărilor spre găsirea unor agenți antitumorali non-platinici pe bază de metale tranziționale, mai activi și mai puțin toxici. Complecșii ruteniului(II) și ruteniului(III) au cinetici de schimb de ligand similare cu cele ale complecșilor de platină(II) și ca urmare prezintă efecte biologice similare cu cele ale medicamentelor platinice. O altă proprietate a ruteniului care îl face foarte apreciat în chimia medicinală este tendința sa de a lega selectiv biomoleculele, care dă socoteală parțial de toxicitatea scăzută a medicamentelor cu ruteniu (Allardyce, C.S., Dyson, P.J., Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects. *Platinum Metals Rev.* 2001, 45, 62-69; Lentzen, O., Moucheron, C., Kirsch-De Mesmaeker, A., *Metallotherapeutic drugs & metal-based diagnostic agents.* John Wiley & Sons, Ltd: West Sussex, 2005, 359-378). Dintre compușii ruteniului(III), două clase s-au impus ca fiind cei mai promițători.

Primul tip de complecși, obținuți de Keppler și colab. (Keller, H., Keppler, B., Medicament formulations containing ruthenium compounds with an antitumoral action, US Patent, 4843069, 1989) sunt complecși anionici ai ruteniului(III) cu liganzi donori de azot heterociclici monodentați, cel mai de succes dintre aceștia având formula *trans*-[RuCl<sub>4</sub>(L)<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, unde L este imidazol (KP418) sau indazol (KP1019 și KP1339), iar contraionul este (LH)<sup>+</sup> sau Na<sup>+</sup>. Formulele structurale pentru trei dintre acești complecși sunt:



KP1019 și KP1339 s-au dovedit activi în inhibarea carcinoamelor colorectale rezistente la platină la șobolani (Kapitza, S., Pongratz, M., Jakupec, M.A., Heffeter, P., Berger, W., Lackinger, L., Keppler, B.K., Marian, B., Heterocyclic complexes of ruthenium(III) induce apoptosis in colorectal carcinoma cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2005, 131, 101-110). KP1019 a completat recent faza I a trialurilor clinice (Hartinger, C.G., Zorbas-Seifried, S., Jakupec, M. A., Kynast, B., Zorbas, H., Keppler, B.K., From bench to bedside – preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). *J. Inorg. Biochem.* 2006, 100, 891-904).

O a doua serie de compuși de ruteniu(III), inspirată din compușii mai sus menționați, este reprezentată de complexii dimetilsulfoxid-ruteniu (Mestroni, G., Alessio, E., and Sava, G. New salt of anionic complexes of Ru(III) as antimetastatic and antineoplastic agents. International Patent, PCT C 07F 15/00, A61K 31/28. WO 98/00431,1998). Cei mai activi din serie sunt compușii  $\text{Na}\{\text{trans-}[\text{Ru(III)Cl}_4(\text{dmsO})(\text{Him})]\}$ , (Him = imidazol), denumit NAMI, și  $[\text{H}_2\text{Im}][\text{trans-Ru(III)Cl}_4(\text{dmsO})(\text{Him})]$ , cunoscut și ca NAMI-A, mai stabil.



În ambele cazuri, ligandul dmso este coordonat prin intermediul atomului de S. NAMI-A prezintă activitate antimetastatică asupra unui domeniu larg de tumori, care includ metastazele pulmonare (Sava G., Salerno G., Bergamo A., Cocchietto M., Gagliardi R., Alessio E., Mestroni G. Reduction of lung metastases by  $\text{Na}[\text{trans-RuCl}_4(\text{DMSO})\text{Im}]$  is not coupled with the induction of chemical xenogenization. *Metal Based Drugs*, 3, 67-73, 1996) și a completat recent faza I a studiilor clinice.

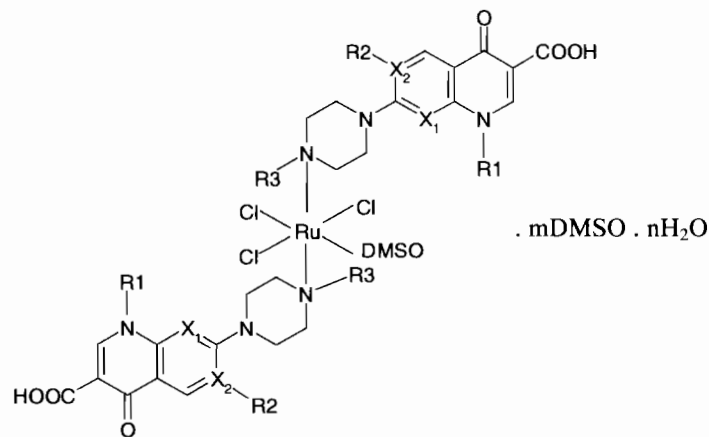
Una dintre direcțiile importante în proiectarea de complecși cu acțiune terapeutică o constituie selectarea unor liganzi cu acțiune farmacologică proprie. Chinolonele sunt agenți antibacterieni care blochează replicarea ADN prin inhibiția topizomerazelor de tipul II și IV (Shen, L.L., Mitscher, L.A., Sharm, P.N., O' Donnell, T.J., Chu, W.T.D., Cooper, C.S., Rosen, T., Pernet, A.G., Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug-DNA binding model. *Biochemistry*, 1989, 28, 3886-3894; Drlica, K., Zhao, X., DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1997, 61, 377-392). O serie de studii demonstrează interacțiunea chinolonelor cu ADN-ul (Lee, H.M., Kim, J.K., Kim, S.K., Molecular modeling study of the norfloxacin-DNA-complex. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2002, 19, 1083-1091; Bailly, C., Colson, P., Houssier, C., The orientation of norfloxacin bound to double-stranded DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, 243, 844-48), o premisă importantă a activității citotoxice a unui compus. Într-adevăr, a fost demonstrată acțiunea citotoxică sau antitumorală pentru o serie de chinolone, cum sunt fleroxacina, ciprofloxacina, trovafloxacina (Ebisuno, S., Inagaki, T., Kojimoto, Y., Ohkawa, T., The cytotoxic effects of fleroxacin and ciprofloxacin on transitional cell carcinoma in Vitro. *Cancer* 1997, 80, 2263-2267; Thadepalli, H., Salem, F., Chuah, S. K., Gollapudi, S., Antitumor Activity of Trovafloxacin in an Animal Model. *In Vivo* 2005, 19, 269-276).

În numeroase cazuri, sinteza compușilor coordinativi necesită încălzirea amestecului de reacție. În prezent, transformările conduse termic pot avea loc pe două căi: încălzire convențională sau accelerată cu microunde. În cazul încălzirii convenționale, de tip exterior-interior, căldura este condusă în substanță, trecând mai întâi prin pereții vasei pentru a ajunge la solvent și reactanți. Aceasta este o metodă lentă și inefficientă pentru a transfera energia în sistemul de reacție. În al doilea caz, microundele se cupleză direct cu moleculele întregului amestec de reacție, conducând la o creștere rapidă a temperaturii. Astfel, încălzirea este de tipul interior-exterior. Deoarece procesul nu este limitat de conductivitatea termică a vasei, rezultatul este o supraîncălzire localizată instantaneu a oricărei substanțe care va răspunde fie la dipol rotație, fie la conducția ionică – cele două mecanisme fundamentale pentru transferul energiei de la microunde la substanța(ele) de încălzit (Hayes, B. L. *Microwave Synthesis: Chemistry at the Speed of Light*, CEM Publishing: Matthews, NC, 2002). Încălzirea asistată de micrunde în condiții controlate este o tehnologie neprețuită pentru aplicații în chimia medicinală și descoperirea de noi medicamente, deoarece timpul de reacție este redus de la zile sau ore la minute sau chiar secunde (Kappe, C.O., Stadler, A., *Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry*. Wiley-VCH, Weinheim, 2005). De

asemenea, optimizarea metodei (stabilirea parametrilor de reacție, ca temperatura și timpul de reacție, variații ale solvenților, aditivilor și catalizatorilor, rapoartele molare ale reactanților) se poate realiza în câteva ore (C. O. Kappe, Dallinger D. Nature Reviews Drug Discovery, 2006, 5, 51-64). Sunt mult îmbunătățite randamentul de obținere și puritatea produsului, prin reducerea unor reacții secundare nedorite comparativ cu metodele de încălzire convenționale. Se cunosc puțini compuși de Ru(III) obținuți prin sinteză cu microunde. Dintre acestea, mai importante sunt cele cu ftalocianine și naftalocianine de tipul [PcRu(py)<sub>2</sub>] și PcRu(Cl) (Rawling, T., McDonagh, A., Ruthenium phthalocyanine and naphthalocyanine complexes: Synthesis, properties and applications. Coord. Chem. Rev. 2007, 251, 1128–1157).

Prezenta invenție propune noi compuși ai ruteniului(III) cu liganzi micști, un derivat chinolonic și dimetilsulfoxid, care să combine acțiunea ionului metalic și cea a liganzilor. Compușii au fost preparați în dimetilsulfoxid, prin încălzire convențională și cu microunde și prezintă acțiune antitumorală.

Invenția se referă la combinații de ruteniu(III) cu formula generală [RuCl<sub>3</sub>(DMSO)(L)<sub>2</sub>] · mDMSO · nH<sub>2</sub>O, prezentând formula structurală:




în cazul în care:


dacă X<sub>1</sub> = N, X<sub>2</sub> = N, R<sub>1</sub> = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = H, m = 0, n = 2, compusul este [RuCl<sub>3</sub>(DMSO)(pip)<sub>2</sub>] · 2H<sub>2</sub>O (pip = acid pipemidic);


dacă X<sub>1</sub> = N, X<sub>2</sub> = H, R<sub>1</sub> = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>2</sub> = F, R<sub>3</sub> = H, m = 0, n = 0, compusul este [RuCl<sub>3</sub>(DMSO)(enx)<sub>2</sub>] (enx = enoxacină);

dacă X<sub>1</sub> = H, X<sub>2</sub> = H, R<sub>1</sub> = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>2</sub> = F, R<sub>3</sub> = H, m = 0, n = 1, compusul este [RuCl<sub>3</sub>(DMSO)(nf)<sub>2</sub>] · H<sub>2</sub>O (nf = norfloxacină);

dacă X<sub>1</sub> = H, X<sub>2</sub> = H, R<sub>1</sub> =  $\Delta$ , R<sub>2</sub> = F, R<sub>3</sub> = H, m = 1, n = 2, compusul este [RuCl<sub>3</sub>(DMSO)(cp)<sub>2</sub>] · DMSO · 2H<sub>2</sub>O (cp = ciprofloxacină);

dacă X1 = H, X2 = H, R1 = , R2 = F, R3 = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, m = 0, n = 1, compusul este [RuCl<sub>3</sub>(DMSO)<sub>0.5</sub>(enro)<sub>2</sub>]-H<sub>2</sub>O (enro = enrofloxacină);

dacă X1 = H, X2 = H, R1 = , R2 = F, R3 = CH<sub>3</sub>, m = 0, n = 1, compusul este [RuCl<sub>3</sub>(DMSO)(of)<sub>2</sub>]-H<sub>2</sub>O (of = ofloxacină);

dacă X1 = H, X2 = H, R1 = , R2 = F, R3 = CH<sub>3</sub>, m = 1, n = 8, compusul este [RuCl<sub>3</sub>(DMSO)(levof)<sub>2</sub>]-DMSO·8H<sub>2</sub>O (levof = levofloxacină),

la un procedeu de preparare a compușilor de ruteniu(III) cu chinolone prin dizolvarea ligandului chinolonic în dimetilsulfoxid (DMSO), prin adăugarea de RuCl<sub>3</sub> anh sau cantitatea corespunzătoare de sare hidratată astfel încât raportul dintre reactanți (ion metalic: ligand:solvent) să fie de 1:2:422. Amestecul rezultat se încălzește fie la reflux la 180°C pe un agitator magnetic cu încălzire timp de 6 ore, fie la 200°C în prezența microundelor timp de 20 minute. După răcire, la soluția brună obținută se adaugă un volum dublu de soluție de NaCl 2M. Precipitatul brun obținut se separă prin creuzet filtrant G4, se spală cu apă distilată până când apele de spălare nu mai dau reacție pozitivă pentru ionul Cl<sup>-</sup> și se usucă în exsicator.

#### Exemplul 1

a. 0,6066 g acid pipemidic se dizolvă în 30 mL dimetilsulfoxid (DMSO) și se adaugă 0,2074 g RuCl<sub>3</sub> anhidră sau cantitatea corespunzătoare de sare hidratată. Amestecul rezultat se refluxează 6 h la temperatura de 180°C pe un agitator magnetic cu încălzire ; după răcire, la soluția brună obținută se adaugă 60 mL soluție NaCl 2M. Precipitatul brun obținut se separă prin creuzet filtrant G4, se spală cu apă distilată până când apele de spălare nu mai dau reacție pozitivă pentru ionul Cl<sup>-</sup> și se usucă în exsicator.

b. 0.2022 g acid pipemidic se dizolvă în 10 mL dimetilsulfoxid (DMSO) într-o fiolă de sinteză cu capacitatea de 10–20 mL și se adaugă 0.06913 g RuCl<sub>3</sub> anhidră sau cantitatea corespunzătoare de sare hidratată. Fiola se închide ermetic și se introduce într-un aparat Biotage monomod. Parametrii de reacție se setează la următoarele valori: preagitare: 1 min, timp de reacție: 20 minute, temperatura de reacție: 200°C, nivelul microundelor: foarte ridicat. După încheierea sintezei și răcire, fiola se decapsează, proba se transferă într-un pahar Berzelius și se prelucrează astfel: se adaugă 20 mL soluție NaCl 2M pentru obținerea unui precipitat brun, care se filtrează prin creuzet G4 și se spală cu apă distilată până când apele de spălare nu mai dau reacție pozitivă pentru ionul Cl<sup>-</sup>, se esorează și se usucă în exsicator.

Compusul obținut corespunde formulei generale  $[\text{RuCl}_3(\text{DMSO})(\text{pip})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (pip = acid pipemic). Analiza chimică, găsit: C, 38.43; H, 8.31; N, 14.95; S, 3.73; Ru, 10.35%; calculat pentru  $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{Cl}_3\text{N}_{10}\text{O}_9\text{SRu}$ : C, 38.8; H, 8.13; N, 15.08; S 3.44; Ru, 10.88%; IR (pastilare în KBr),  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu(\text{OH})$ , 3426s;  $\nu(\text{C}=\text{O})_c$ , 1719s;  $\nu(\text{C}=\text{O})_p$ , 1640s;  $\nu(\text{S}=\text{O})$ , 1050m.

#### Exemplul 2

Se lucrează similar procedurii de la exemplul 1, folosind următoarele cantități de materii prime:

- 0,6406 g enoxacină și 0,2074 g  $\text{RuCl}_3$  anh sau cantitatea corespunzătoare de sare hidratată.
- 0,2135 g enoxacină și 0.06913 g  $\text{RuCl}_3$  anh sau cantitatea corespunzătoare de sare hidratată.

Compusul obținut corespunde formulei generale  $[\text{RuCl}_3(\text{DMSO})(\text{enx})_2]$  (enx = enoxacină). Analiza chimică, găsit: C, 41.11; H, 4.62; N, 11.95; S, 3.68; Ru, 10.48%; calculat pentru  $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{Cl}_3\text{F}_2\text{N}_8\text{O}_7\text{SRu}$ : C, 41.47; H, 4.32; N, 12.10; S 3.46; Ru, 10.91%; IR (pastilare în KBr),  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu(\text{C}=\text{O})_c$ , 1718m;  $\nu(\text{C}=\text{O})_p$ , 1630s;  $\nu(\text{S}=\text{O})$ , 1021m.

#### Exemplul 3

Se lucrează similar procedurii de la exemplul 1, folosind următoarele cantități de materii prime:

- 0,6387 g norfloxacină și 0,2074 g  $\text{RuCl}_3$  anh sau cantitatea corespunzătoare de sare hidratată.
- 0,2129 g norfloxacină și 0.06913 g  $\text{RuCl}_3$  anh sau cantitatea corespunzătoare de sare hidratată.

Compusul obținut corespunde formulei generale  $[\text{RuCl}_3(\text{DMSO})(\text{nf})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$  (nf = norfloxacină). Analiza chimică, găsit: C, 43.81; H, 4.25; N, 8.49; S, 3.81; Ru, 10.56%; calculat pentru  $\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{Cl}_3\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_8\text{SRu}$ : C, 43.31; H, 4.67; N, 8.92; S 3.39; Ru, 10.72%; IR (pastilare în KBr),  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu(\text{C}=\text{O})_c$ , 1719 s;  $\nu(\text{C}=\text{O})_p$ , 1616s;  $\nu(\text{S}=\text{O})$ , 1022m.

#### Exemplul 4

Se lucrează similar procedurii de la exemplul 1, folosind următoarele cantități de materii prime:

- 0,6627 g ciprofloxacina și 0,2074 g  $\text{RuCl}_3$  anh sau cantitatea corespunzătoare de sare hidratată.

b. 0,2209 g ciprofloxacină și 0.06913 g  $\text{RuCl}_3$  anh sau cantitatea corespunzătoare de sare hidratată.

Compusul obținut corespunde formulei generale  $[\text{RuCl}_3(\text{DMSO})(\text{cp})_2] \cdot \text{DMSO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (cp = ciprofloxacină). Analiza chimică, găsit: C, 42.58; H, 4.51; N, 7.34; S, 6.35; Ru, 9.31%; calculat pentru  $\text{C}_{38}\text{H}_{52}\text{Cl}_3\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_{10}\text{S}_2\text{Ru}$ : C, 42.93; H, 4.89; N, 7.90; S 6.03; Ru, 9.51%; IR (pastilare în KBr),  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu(\text{C}=\text{O})_c$ , 1723 s;  $\nu(\text{C}=\text{O})_p$ , 1615s;  $\nu(\text{S}=\text{O})$ , 1027s.

#### Exemplul 5

Se lucrează similar procedurii de la exemplul 1, folosind următoarele cantități de materii prime:

a. 0,7188 g enrofloxacină și 0,2074 g  $\text{RuCl}_3$  anh sau cantitatea corespunzătoare de sare hidratată.

b. 0,2396 g enrofloxacină și 0.06913 g  $\text{RuCl}_3$  anh sau cantitatea corespunzătoare de sare hidratată.

Compusul obținut corespunde formulei generale  $[\text{RuCl}_3(\text{DMSO})_{0.5}(\text{enro})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$  (enro = enrofloxacină). Analiza chimică, găsit: C, 47.88; H, 5.63; N, 8.94; S; 1.87; Ru, 10.65%; calculat pentru  $\text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{Cl}_3\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_{7.5}\text{S}_{0.5}\text{Ru}$ : C, 47.60; H, 5.19; N, 8.54; S 1.62; Ru, 10.27%; IR (pastilare în KBr),  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu(\text{C}=\text{O})_c$ , 1722s;  $\nu(\text{C}=\text{O})_p$ , 1615s;  $\nu(\text{S}=\text{O})$ , 1026m.

#### Exemplul 6

Se lucrează similar procedurii de la exemplul 1, folosind următoarele cantități de materii prime:

a. 0,7227 g ofloxacină și 0,2074 g  $\text{RuCl}_3$  anh sau cantitatea corespunzătoare de sare hidratată.

b. 0,2409 g ofloxacină și 0.06913 g  $\text{RuCl}_3$  anh sau cantitatea corespunzătoare de sare hidratată.

Compusul obținut corespunde formulei generale  $[\text{RuCl}_3(\text{DMSO})(\text{of})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$  (of = ofloxacină). Analiza chimică, găsit: C, 44.97; H, 4.76; N, 8.63; S, 3.59; Ru, 9.31%; calculat pentru  $\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{Cl}_3\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_{10}\text{SRu}$ : C, 44.44; H, 4.67; N, 8.19; S 3.12; Ru, 9.84%; IR (pastilare în KBr),  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu(\text{C}=\text{O})_c$ , 1721s;  $\nu(\text{C}=\text{O})_p$ , 1617s;  $\nu(\text{S}=\text{O})$ , 1025i.



### Exemplul 7

Se lucrează similar procedurii de la exemplul 1, folosind următoarele cantități de materii prime:

- a. 0,7227 g levofloxacină și 0,2074 g RuCl<sub>3</sub> anh sau cantitatea corespunzătoare de sare hidratată.
- b. 0,2409 g levofloxacină și 0,06913 g RuCl<sub>3</sub> anh sau cantitatea corespunzătoare de sare hidratată.

Complusul obținut corespunde formulei generale [RuCl<sub>3</sub>(DMSO)(levof)<sub>2</sub>].DMSO.8H<sub>2</sub>O (levof = levofloxacină). Analiza chimică, găsit: C, 39.84; H, 5.92; N, 6.43; S, 5.79; Ru, 8.44%; calculat pentru C<sub>40</sub>H<sub>68</sub>Cl<sub>3</sub>F<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>18</sub>S<sub>2</sub>Ru: C, 39.54; H, 5.60; N, 6.92; S 5.27; Ru, 8.32%; IR (pastilare în KBr), cm<sup>-1</sup>: ν(OH), 3424s; ν(C=O)<sub>c</sub>, 1715m; ν(C=O)<sub>p</sub>, 1617s; ν(S=O), 1058m.

### Determinări farmacologice

Materialul biologic a cuprins șobolani Wistar albino obținuți din biobaza Institutului Oncologic "Prof. Dr. Alexandru Trestioreanu" din București, îngrijiți și hrăniți cu alimentație standard preparată local care cuprinde pâine, lapte, morcovi, ovăz și orz asigurându-se toate elementele nutritive de care au nevoie rozătoarele. În plus, se suplimentează lunar alimentația cu minerale din produse farmaceutice și atunci când este cazul se administrează și antibiotice pentru eliminarea eventualelor infecții. Înainte de orice experiment, animalele sunt preluate din Biobază și ținute în condiții standard în laboratoarele de lucru cel puțin 3-4 săptămâni. Se urmăresc zilnic astfel încât în loturile experimentale să fie introduse numai animale sănătoase și care să aibă caracteristici asemănătoare (sex, greutate, vârsta) pentru omogenitatea lotului. Conform principiilor și normelor Eticii în cercetarea științifică experimentală, loturile sunt astfel alese încât să se reducă la maxim numărul indivizilor, existând o justificare a acestora (principiul reducerii), iar manevrele efectuate sunt astfel alese încât să se reducă la minim durerile provocate (principiul limitării durerii).

Testele au fost efectuate pe animale purtătoare de tumori experimentale. S-a folosit carcinosarcomul experimental Walker 256, o tumoră standard utilizată în screening-ul preclinic al substanțelor antitumorale, precum și în diferite modele experimentale de chimio-radio-imunoterapie, dar și în modele de metastazare ganglionară obținute prin tehnica grefei deschise. De asemenea, tumora este utilizată pe scară largă ca model experimental de

inducere a cașexiei la șobolan, sindromul de cașexie fiind cauza majoră de mortalitate în cancer. Acțiunea antitumorală a fost evaluată prin determinarea volumului tumoral.

Volumul tumoral pentru fiecare tumoră în parte se calculează cu relația:

$$V_{\text{tumoral}} = a \times b^2 \times 0,52,$$

unde:

a = diametrul mare al tumorii (mm);

b = diametrul mic al tumorii (mm);

0,52 = grosimea tegumentului (mm).

Administrarea substanțelor s-a realizat în doza de 75 mg / kg corp, folosindu-se vehicul DMSO diluat 1:10 în ser fiziologic. Au fost efectuate gavage orale, administrare per os.

La primul lot (**primul model experimental**), administrarea compușilor a început la 7 zile de la inocularea tumorii. Tratamentul s-a făcut de trei ori pe săptămână, timp de 3 săptămâni. S-a urmărit activitatea antitumorală monitorizată prin greutatea animalelor (cântărite săptămânal) și măsurarea dimensiunii tumorale.

**Al doilea model experimental** a fost inițiat la același tip de animale, purtătoare de aceeași tumoră experimentală, tratamentul a fost început la 14 zile de la inoculare, când dimensiunile tumorale sunt mult mai mari.

#### Exemplul 1

Testarea acțiunii compusului  $[\text{RuCl}_3(\text{DMSO})(\text{nf})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Ru-nf; nf = norfloxacină).

În tabelele care urmează (1-4) sunt exemplificate rezultatele obținute în cele două modele experimentale utilizate.

Tabel 1 Greutatea corporală la lotul tratat cu Ru-nf începând cu ziua a 7-a de la inocularea tumorii

Animal	Înainte de administrare (grame)	Săptămâna 1 de administrare	Săptămâna 2 de administrare	Săptămâna 3 de administrare
1	168,25	183,81	179,07	186,64
2	155,50	178,13	192,98	214,32
3	154,35	173,59	162,99	161,17
Media pe lot	159,35	178,51	178,34	187,37

Se observă că nu s-a înregistrat decesul niciunui individ din lotul tratat. Creșterea greutății individuale se datorează creșterii volumului tumoral.

Tabel 2 Diametrul tumoral la lotul tratat cu Ru-nf începând cu ziua a 7-a de la inocularea tumorii

Animal	Înainte de administrare (mm)	Saptămâna 1 de administrare	Saptămâna 2 de administrare	Saptămâna 3 de administrare
1	20	35 / 42 $\Phi_m$ 38,5	34 / 55 $\Phi_m$ 44,5	36 / 54 $\Phi_m$ 45
2	20	32 / 34 $\Phi_m$ 33	42 / 47 $\Phi_m$ 44,5	47 / 50 $\Phi_m$ 48,5
3	18	25 / 30 $\Phi_m$ 27,5	26 / 34 $\Phi_m$ 30	23 / 37 $\Phi_m$ 30
Media pe lot	19	33	39,66	41,16

Pe baza acestor date se poate afirma că *inițierea unui tratament la 7 zile* de la inocularea celulelor tumorale, când tumora este vizibilă și măsurabilă *nu a indus un efect antitumoral*, tumora a crescut fără ca substanța să inducă efecte toxice pronunțate, cauzatoare de deces la animalele tratate.

Tabel 3 Greutatea corporală la lotul tratat cu Ru-nf începând cu ziua a 14-a de la inocularea tumorii

Animal	Înainte de administrare (grame)	Saptămâna 1 de administrare	Saptămâna 2 de administrare
1	194,08	211,41	215,99
2	212,49	189,92 Necroză tumorală superficială, depilație, ulcerare	186,91
3	222,25	221,56	225,10
Media pe lot	209,60	207,63	209,33

La 14 zile de la inocularea celulelor tumorale, la un singur individ s-a înregistrat o necroză tumorală, fenomen care poate fi și natural.

Tabel 4 Diametrul tumoral la lotul tratat cu Ru-nf începând cu ziua a 14-a de la inocularea tumorii

Animal	Înainte de administrare (mm)	Saptămâna 1 de administrare	Saptămâna 2 de administrare
1	30 / 36 Φ <sub>m</sub> 33	47 / 58 Φ <sub>m</sub> 52,5	48 / 54 Φ <sub>m</sub> 51
2	38 / 41 Φ <sub>m</sub> 39,5	42 / 52 Φ <sub>m</sub> 47	46 / 55 Φ <sub>m</sub> 50,5
3	26 / 30 Φ <sub>m</sub> 28	Nodul mic, abia palpabil	Lipsa tumoră
Media pe lot	33,5	49,75	50,75

S-a obținut o rejecție spontană și totală a unei tumori. S-a efectuat examenul necropsic care a arătat existența unei tumori invazive, cu necroză avansată de tip cazeos, fără alte modificări vizibile ale viscerelor și musculaturii.

#### Exemplul 2

Testarea acțiunii compusului  $[RuCl_3(DMSO)(of)_2] \cdot H_2O$  (Ru-of; of = ofloxacină).

În tabelele care urmează (5-8) sunt exemplificate rezultatele obținute în cele două modele experimentale utilizate.

Tabel 5 Greutatea corporală la lotul tratat cu Ru-of începând cu ziua a 7-a de la inocularea tumorii

Animal	Înainte de administrare (grame)	Saptămâna 1 de administrare	Saptămâna 2 de administrare	Saptămâna 3 de administrare
1	134,99	152,51	134,40	143,81
2	138,61	Mort după 3 administrări		
3	148,46	174,28	162,19	170,03
Media pe lot	140,68	163,39	148,29	156,92

Se înregistrează un deces după 3 administrări.

Tabel 6 Diametrul tumoral la lotul tratat cu Ru-oflo începând cu ziua a 7-a de la inocularea tumorii

Animal	Înainte de administrare (mm)	Saptămâna 1 de administrare	Saptămâna 2 de administrare	Saptămâna 3 de administrare
1	19	25 / 31 $\Phi_m$ 28	21/ 23 $\Phi_m$ 22	14 /14 $\Phi_m$ 14
2	21	Mort		
3	19	16 / 22 $\Phi_m$ 19	5 mm Nodul indurat	Dispariție tumoră (animal foarte nervos)
Media pe lot	19,6	23,5	13,5	

Aceste rezultate indică încă o *rejecție tumorală* la un animal care manifestă o toxicitate dată de compusul testat printr-o stare de agitație, nervozitate excesivă. Se înregistrează și o diminuare a dimensiunilor tumorale la ceilalți indivizi.

Tabel 7 Greutatea corporală la lotul tratat cu Ru-oflo începând cu ziua a 14-a de la inocularea tumorii

Animal	Înainte de administrare (grame)	Saptămâna 1 de administrare	Saptămâna 2 de administrare
1	177,63	173,98	183,76
2	160,01	Mort după 2 administrări	
3	174,26	176,18	176,70
Media pe lot	170,63	175,08	180,23

Greutatea corporală crește ca urmare a măririi greutateii tumorii.

Tabel 8 Diametrul tumoral la lotul tratat cu Ru-oflo începând cu ziua a 14-a de la inocularea tumorii

Animal	Înainte de administrare (mm)	Saptămâna 1 de administrare	Saptămâna 2 de administrare
1	32	10 rejecție spontană	Nodul mic, abia palpabil
2	39 / 44 $\Phi_m$ 41,5	Mort	
3	27 / 36 $\Phi_m$ 31,5	43 / 46 $\Phi_m$ 44,5	46 / 53 $\Phi_m$ 49,5
Media pe lot	35	27,25	49,5

Examenul necropsic efectuat la animalul decedat a arătat existența unei tumori invazive, cu necroză avansată de tip cazeos, fără alte modificari vizibile ale viscerelor și musculaturii.


Administrarea per os a acestor compuși nu a indus o toxicitate excesivă. Datele biochimice arată că substanțele studiate nu prezintă o toxicitate pronunțată. Creșterea fosfatazei alcaline și scăderea proteinelor totale (tabelul 9) sunt singurele modificări.


Tabel. 9. Modificări biochimice observate consecutiv administrării intraperitoneale

	martor	Ru-norflo	Ru-oflo
GPT ( U/l)	17	15	21
GOT (U/l)	136	134	111
Fosfataza alcalina (U/L)	253	334 ↑	316 ↑
Glicemie (mg / dl)	174	139	145
Uree (mg / dl)	< 2	5 ↑	6,4 ↑
Proteine totale (g / l)	6,6	4,7 ↓	4,1 ↓

Creșterea uremiei și scăderea proteinemiei poate fi interpretată ca un sindrom de origine renală nefrotică, o toxicitate inflamatorie observată doar în cazul administrării intraperitoneale, fără a se înregistra fenomene toxice la administrarea per os.



7. Compus conform revendicării 1 în care pentru  $X1 = H$ ,  $X2 = H$ ,  $R1 =$  ,  $R2 = F$ ,  $R3 = CH_3$ ,  $m = 0$ ,  $n = 1$ , compusul este  $[RuCl_3(DMSO)(of)_2] \cdot H_2O$  ( $of =$  ofloxacină).

8. Compus conform revendicării 1 în care pentru  $X1 = H$ ,  $X2 = H$ ,  $R1 =$  ,  $R2 = F$ ,  $R3 = CH_3$ ,  $m = 1$ ,  $n = 8$ , compusul este  $[RuCl_3(DMSO)(levof)_2] \cdot DMSO \cdot 8H_2O$  ( $levof =$  levofloxacină).

9. Procedeu de preparare a compușilor de la revendicarea 1 caracterizat prin aceea că se dizolvă ligandul chinolonă și clorura de ruteniu(III) anhidră sau hidratată în dimetilsulfoxid în raport molar ion metalic:ligand:solvent de 1:2:42, proba se încălzește sub agitare prin încălzire convențională sau la microunde, după care, se răcește proba, se adaugă o soluție 2M de clorură de sodiu pentru obținerea unui precipitat brun, care se filtrează prin creuzet filtrant G4, se spală cu apă distilată și se usucă în exsicator.

10. Procedeu conform revendicării 9, caracterizat prin aceea că proba se încălzește la reflux la  $180^\circ C$  timp de 6 ore în cazul desfășurării reacției prin încălzire convențională.

11. Procedeu conform revendicării 9, caracterizat prin aceea că proba se încălzește în fiolă închisă la  $200^\circ C$  timp de 20 de minute în cazul desfășurării reacției la microunde.

12. Compus de la revendicarea 1 pentru utilizare ca agent antitumoral.