



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00944

(22) Data de depozit: 29/11/2016

(41) Data publicării cererii:  
30/05/2018 BOPI nr. 5/2018

(71) Solicitant:

- UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "CAROL DAVILA" DIN BUCUREȘTI, STR. DIONISIE LUPU NR. 37, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI, BD. MIHAIL KOGĂLNICEANU NR. 36-46, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- INSTITUTUL DE VIRUSOLOGIE "ȘTEFAN S. NICOLAU", ȘOS. MIHAI BRAVU NR. 285, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

- UIVAROSI VALENTINA, BD. ALEXANDRU OBREGIA NR. 31, BL. 15, SC. 2, ET. 4, AP. 49, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;

- ARAMĂ CORINA-CRISTINA, CALEA GRIVIȚEI NR. 395, BL. M, SC. 2, AP. 24, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- BĂRBUCEANU ȘTEFANIA-FELICIA, STR. LABORATOR NR. 125-127, BL. S1, SC. 2, AP. 80, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
- BRAȘOVEANU LORELEI IRINA, STR. NICOLAE CARAMFIL NR. 40, BL. 10B, SC. 1, ET. 1, AP. 1, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- MIHĂILĂ MIRELA ANTONELA, STR. BRAȘOV NR. 24, BL. 717, SC. B, ET. 1, AP. 41, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- BADEA ELENA MIHAELA, STR. DUMBRAVA NOUĂ NR. 35, BL. S22, AP. 93, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
- OLAR MARIOARA RODICA, STR. CRINUL DE PĂDURE NR. 3, BL. G 6, SC. 1, AP. 28, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) COMPLECȘI DE ASOCIERE HIDROXIPROPIL- $\beta$ -CICLODEXTRINĂ/COMPUȘI DE RUTENIU ȘI UTILIZARE TERAPEUTICĂ

(57) Rezumat:

Invenția se referă la complecși de asociere cu acțiune antitumorală, și la un procedeu de obținere a acestora. Complecșii conform invenției au formula generală  $[RuCl_3(L)_2(DMSO)] HP \beta CD$ , în care L este acid pipemidic, enoxacină, norfloxacină, ciprofloxacina, enrofloxacină, ofloxacină, levofloxacină, și HP  $\beta$  CD este (2-hidroxipropil)- $\beta$ -ciclodextrină. Procedeu conform

invenției constă în adăugarea unei soluții apoase de ciclodextrină la o soluție slab alcalină de complex de ruteniu, în raport molar 2:1, urmată de neutralizare, filtrare și uscare.

Revendicări: 11

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



## COMPLECȘI DE ASOCIERE HIDROXIPROPIL- $\beta$ -CICLODEXTRINĂ/COMPUȘI DE RUTENIU ȘI UTILIZARE TERAPEUTICĂ

Invenția se referă la compuși de asociere între hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrină și o serie de complecși de ruteniu(III) cu chinolone și dimetilsulfoxid, la prepararea și la utilizarea compuşilor obținuți pentru acțiunea antitumorală.

Tendințele emergente în chimia combinatorie și designul medicamentului au dus la dezvoltarea de molecule farmacologic active cu lipofilie accentuată, cu greutate moleculară mare și solubilitate scăzută în apă. Problemele asociate cu solubilitatea scăzută pot duce la o biodisponibilitate scăzută, având ca efect cedarea suboptimală a medicamentului (Kalepu S, Nekkanti V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. Acta Pharmaceutica Sinica B 2015; 5(5):442–453). Aproximativ 40% din medicamentele cu aprobare de punere pe piață și aproape 90% din moleculele din rezerva de cercetare sunt puțin solubile în apă. (Takagi T, et al. A provisional biopharmaceutical classification of the Top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain and Japan. Molecular Pharmaceutics 2006; 3(6):631–643). Această stare de fapt nu se va îmbunătăți în perspectivă, întrucât cele mai multe dintre medicamente în dezvoltare demonstrează o solubilitate redusă: o treime din medicamente în dezvoltare sunt greu solubile, iar două treimi din medicamentele sintetizate au solubilități scăzute (Dubin CH. Formulation strategies for poorly soluble drugs. Drug Delivery Technology 2006; 6(6):34–38).

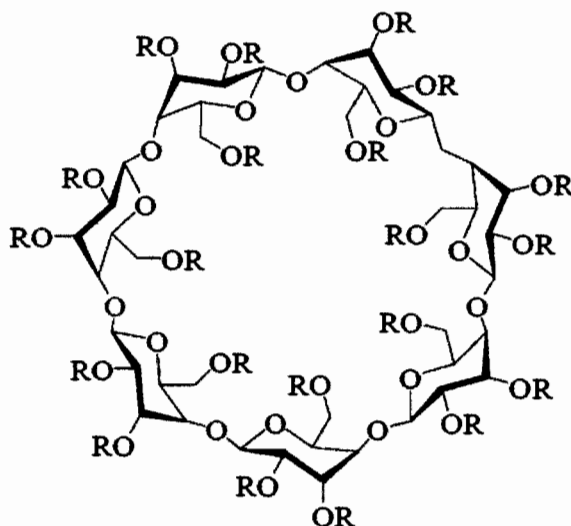
Pentru a depăși problemele de solubilitate și, prin asociere, de biodisponibilitate, au fost dezvoltate numeroase tehnici (Das N, Das S. Formulation of poorly soluble drugs. Drug Delivery Report Spring/Summer 2006:52–55), una dintre aceste tehnici fiind reprezentată de obținerea de complecși cu ciclodextrine.

Ciclodextrinele sunt macromolecule stabile fizic și chimic, produse prin degradarea enzimatică a amidonului, cu formă de trunchi de con sau de tor (inel) mai degrabă decât de cilindru perfect, datorită conformației scaun a unității glucopiranoză. Sunt solubile în apă, biocompatibile, cu suprafața exterioară hidrofilă și cavitatea lipofilă. Ciclodextrinele și derivații lor au fost utilizate pe scară largă ca gazde pentru a crește solubilitatea redusă a moleculelor organice oaspete greu solubile în apă, prin formarea complecșilor de incluziune (Duchene D, Wouessidjewe D, Ponchel G. Cyclodextrins and carrier systems. Journal of

Controlled Release 1999; 62(1-2):263-268, Martin Del Valle, EM. Cyclodextrins and their uses: A review. Process Biochemistry 2004; 39(9):1033-1046).

Ciclodextrinele se clasifică în ciclodextrine naturale și derivate. Cele mai frecvent utilizate ciclodextrine naturale sunt  $\alpha$ ,  $\beta$  și  $\gamma$ , formate din 6, 7 și 8 unități glucopiranoză. Acestea sunt substanțe cristaline, omogene și ne higroscopice. Dintre acestea,  $\beta$ -ciclodextrina este ideală pentru complexarea substanțelor farmacologic active, datorită dimensiunii perfecte a cavității, care permite încărcarea eficientă și creșterea disponibilității și costului relativ scăzut.

Diversi derivați hidrofilii, hidrofobi și ionici și au fost dezvoltăți și utilizați pentru a îmbunătăți proprietățile fizico-chimice și biofarmaceutice ale medicamentelor și pentru a spori capacitatea de incluziune a ciclodextrinelor naturale:



Ciclodextrina	R = H sau
$\beta$ -Ciclodextrina	-H
2-Hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina	$-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$
Sulfobutyleter- $\beta$ -ciclodextrina sare de sodiu	$-(\text{CH}_2)_4\text{SO}_3\text{Na}^+$
$\beta$ -Ciclodextrina metilată aleator	$-\text{CH}_3$
$\beta$ -Ciclodextrina ramificată	Grupe glucozil sau maltozil

#### Structura $\beta$ -ciclodextrinei și a derivaților săi

Derivații de ciclodextrină de interes farmaceutic includ derivații hidroxiopropil ai  $\beta$ - și  $\gamma$ -ciclodextrinei,  $\beta$ -ciclodextrina metilată aleator, sulfobutyleter- $\beta$ -ciclodextrina, și așa-numitele ciclodextrine ramificate, cum ar fi glucozil- $\beta$ -ciclodextrina.

Complecșii de incluziune noncovalenți sau gazdă-oaspete rezultați sunt de interes științific și tehnologic actual pentru proprietățile lor biologice, fizice și chimice speciale. Asemenea

asociații noncovalente nu numai că pot îmbunătăți solubilitatea în apă, biodisponibilitatea și stabilitatea moleculei oaspete, dar pot regla, de asemenea, eliberarea moleculelor oaspete (Loftsson T, Duchene, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics* 2007; 329(1–2):1–11, Szente L, Szejtli JZ Highly soluble cyclodextrin derivatives: Chemistry, properties, and trends in development. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1999; 36(1):17–28).

Una dintre cele mai importante și actuale aplicații a ciclodextrinelor o constituie îmbunătățirea proprietăților medicamentelor antitumorale (Gidwani B, Amber V. A comprehensive review on cyclodextrin-based carriers for delivery of chemotherapeutic cytotoxic anticancer drugs. *BioMed Research International* 2015, Article ID 198268, 15 pages). Principalele neajunsuri ale medicamentelor anticancer sunt reprezentate de solubilitatea limitată în apă (hidrofobia), degradarea în fluidele gastrointestinale, insuficienta stabilitate *in vitro* (exprimată de termenul de valabilitate), biodisponibilitatea scăzută, stabilitatea scurtă *in vivo* (exprimată de timpul de înjumătățire), afinitatea pentru citocromului P450 (CYP3A4) intestinal și hepatic și pentru glicoproteina P (P-gp) în bariera intestinală, permeabilitatea intestinală redusă și efecte secundare puternic dependente de doză. Lipsa de selectivitate și timpul scurt în circulația sanguină care provoacă diverse efecte secundare toxice sunt, de asemenea, probleme de interes major (Zhang J, Lan CQ, Post M, Simard B, Deslandes Y, Hsieh TH. Design of nanoparticles as drug carriers for cancer therapy. *Cancer Genomics&Proteomics* 2006; 3(3-4):147– 157).

Ciclodextrinele sunt capabile să depășească unele dintre aceste neajunsuri ale medicamentelor anticancer. În acest sens, complexii cisplatin cu hidroxipropil-beta-ciclodextrină (HP- $\beta$ -CD) obținuți în rapoarte molare 1:1 și 1:2 în stare solidă și respectiv 1:1 în soluție, cu o stabilitate fizică și chimică mulțumitoare, au determinat o îmbunătățire semnificativă a solubilității și vitezei de dizolvare a cisplatin (Balaji A, Pandey VP, Srinath MS, Manavalan R. Synthesis and characterization studies of Cisplatin/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin complex. *Pharmacologyonline* 2009; 1:1135-1143).

Mai multe studii de incluziune s-au realizat pentru analogul de generație a doua al cisplatin, 1,1-ciclobutanedicarboxilatodiamminplatin (II), carboplatin, folosind ca ciclodextrine complexante  $\alpha$ -ciclodextrina (Alston DR, Lilley TH, Stoddart JF. The binding of 1,1-cyclobutanedicarboxylatodiammineplatinum (II) by  $\alpha$ -cyclodextrin in aqueous solution. *Journal of Chemical Society, Chemistry Communications* 1985; 22:1602-1604) sau hidroxipropil- $\alpha$ -ciclodextrina (Utsuki T, Brem H, Pitha J, Loftsson T, Kristmundsdottir T,

Tyler BM, Olivi A. Potentiation of anticancer effects of microencapsulated carboplatin by hydroxypropyl  $\alpha$ -cyclodextrin *Journal of Controlled Release* 1996; 40:251-260). Compusul anticancer 1,1-ciclobutandicarboxilatodiamminplatin (II) devine mai solubil în apă și mai ușor administrabil și /sau asimilabil în circulația sistemică sub forma complexului de incluziune 1: 1 cu  $\alpha$ -ciclodextrină. Complexul de incluziune, procedeul de preparare și o serie de compoziții farmaceutice care au la bază acest complex constituie obiectul unui brevet de invenție (Stoddart J, Alston DR. Solubilized platinum compound. US Patent 4,696,918 Sep. 29, 1987) .

O serie de complecși de incluziune și de preparate farmaceutice stabile au fost obținuți și brevetati și pentru alți complecși ai platinei (Shima K, Tsukada T, Kagawa, H. Stable freeze-dried preparations of an anticancer platinum complex. US Patent 4,767,874 Aug. 30, 1988, Zak F, Mistr A, Poulouva A; Melka M, Turanek J, Zaluska D. Platinum complex, its preparation and therapeutic application. US Patent 6,350,737 B1 Feb. 26, 2002

Prezenta invenție propune noi complecși de asociere între complecși ai ruteniului(III) cu liganzi micști (un derivat chinolonic și dimetilsulfoxid) și (2-hidroxiopropil)-beta-ciclodextrină (HP $\beta$ CD), metodă de preparare a acestora și utilizarea complecșilor de asociere ca agenți antitumorali. Hidroxipropil betaciclodextrina (HP $\beta$ CD) are o solubilitate în apă mare (peste 600 mg/mL) și un profil sigur dovedit, în special pentru uz parenteral.

Aceste caracteristici combinate oferă oportunități de formulare uriașe, deoarece:

- procesul de complexare este ușurat mult în comparație cu  $\beta$ -ciclodextrina naturală
- siguranța biologică a acestui excipient permite o utilizare mai largă și mai multe căi

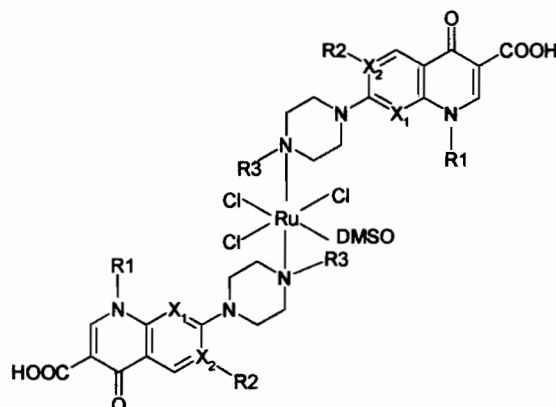
de administrare.

Utilizarea HP $\beta$ CD determină îmbunătățirea unor proprietăți ale substanțelor medicamentoase:

- crește solubilitatea
- crește viteza de dizolvare
- crește biodisponibilitatea
- reduce efectele adverse
- crește stabilitatea.

Asocierea compușilor de ruteniu (III) cu HP $\beta$ CD s-a realizat cu scopul creșterii solubilității complecșilor metalici respectivi și evidențierea efectului asocierii asupra acțiunii antitumorale.

Invenția se referă la complecși de asociere cu formula generală  $[\text{RuCl}_3(\text{L})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{CD}$ , unde HP $\beta$ CD este (2-hidroxipropil)-beta-ciclodextrina, iar pentru complexul  $[\text{RuCl}_3(\text{L})_2(\text{DMSO})]$ , cu formula de structură:



dacă  $X_1 = \text{N}$ ,  $X_2 = \text{N}$ ,  $R_1 = \text{C}_2\text{H}_5$ ,  $R_2 = -$ ,  $R_3 = \text{H}$ , complexul de asociere este  $[\text{RuCl}_3(\text{pip})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{-CD}$  (pip = acid pipemidic);

dacă  $X_1 = \text{N}$ ,  $X_2 = \text{C}$ ,  $R_1 = \text{C}_2\text{H}_5$ ,  $R_2 = \text{F}$ ,  $R_3 = \text{H}$ , complexul de asociere este  $[\text{RuCl}_3(\text{enx})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{-CD}$  (enx = enoxacină);

dacă  $X_1 = \text{CH}$ ,  $X_2 = \text{C}$ ,  $R_1 = \text{C}_2\text{H}_5$ ,  $R_2 = \text{F}$ ,  $R_3 = \text{H}$ , complexul de asociere este  $[\text{RuCl}_3(\text{nf})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{-CD}$ , (nf = norfloxacină);

dacă  $X_1 = \text{CH}$ ,  $X_2 = \text{C}$ ,  $R_1 = \triangle$ ,  $R_2 = \text{F}$ ,  $R_3 = \text{H}$ , complexul de asociere este  $[\text{RuCl}_3(\text{cp})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{-CD}$ , (cp = ciprofloxacină);

dacă  $X_1 = \text{CH}$ ,  $X_2 = \text{C}$ ,  $R_1 = \triangle$ ,  $R_2 = \text{F}$ ,  $R_3 = \text{C}_2\text{H}_5$ , complexul de asociere este  $[\text{RuCl}_3(\text{enro})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{-CD}$ , (enro = enrofloxacină);

dacă  $X_1 = \text{CH}$ ,  $X_2 = \text{C}$ ,  $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{F}$ ,  $R_3 = \text{CH}_3$ , complexul de asociere este  $[\text{RuCl}_3(\text{of})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{-CD}$ , (of = ofloxacină);

dacă  $X_1 = \text{CH}$ ,  $X_2 = \text{C}$ ,  $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{F}$ ,  $R_3 = \text{CH}_3$ , complexul de asociere este  $[\text{RuCl}_3(\text{levof})_2(\text{DMSO})] \cdot (\text{C}_{59}\text{H}_{109}\text{O}_{40})$ , (levof = levofloxacină),

la un procedeu de preparare a compușilor de asociere prin adăugarea unei soluții apoase de ciclodextrină la o soluție slab alcalină de complex de ruteniu în raport molar 1:2 complex de ruteniu: ciclodextrină, urmată de neutralizare, filtrare și uscarea, la un procedeu de preparare prin triturarea reactanților umectați cu puțină apă, în raport molar 1:1 complex de ruteniu: ciclodextrină, urmată de uscarea la 60°C până la pondere constantă și la utilizarea compușilor obținuți pentru acțiunea antitumorală.

#### EXEMPLUL 1

##### Prepararea complecșilor $[\text{RuCl}_3(\text{L})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{CD}$

Prepararea complecșilor s-a realizat prin metoda neutralizării, iar pentru complexul  $[\text{RuCl}_3(\text{pip})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{CD}$  s-a folosit metoda triturării.

##### **Procedeu de lucru - metoda neutralizării**

O cantitate de complex echivalentă la 1 mmol se aduce într-un pahar Berzelius, se adaugă 75-80 mL apă și 5-6 mL NaOH 0,01M. Se agită amestecul până la dizolvare completă. Se adaugă 2 mmoli de ciclodextrină dizolvată în 20 mL apă. Soluția obținută se agită 2h (agitare magnetică) la temperatura camerei, apoi se neutralizează (pH 6-7) amestecul, folosind o soluție 0,1M de HCl, sub control potențiomtric. Complexul precipitat se filtrează prin membrană cu pori de 0,45  $\mu\text{m}$ , se spală cu 25-30 mL apă și se usucă la 60°C până la pondere constantă.

##### **Procedeu de lucru - metoda triturării**

O cantitate de complex echivalentă la 1 mmol se triturează energic, 30 minute, într-un mojar, cu 1 mmol de ciclodextrină, folosind ca agent de umectare apa. Complexul preparat se usucă la 60°C până la pondere constantă.

#### EXEMPLUL 2

##### Determinarea stoechiometriei complecșilor $[\text{RuCl}_3(\text{L})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{CD}$

Stoechiometria complecșilor s-a determinat pe baza rezultatelor analizei elementale.

Tabel 1: Analiza elementală a complexelor  $[\text{RuCl}_3(\text{L})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{CD}$ 

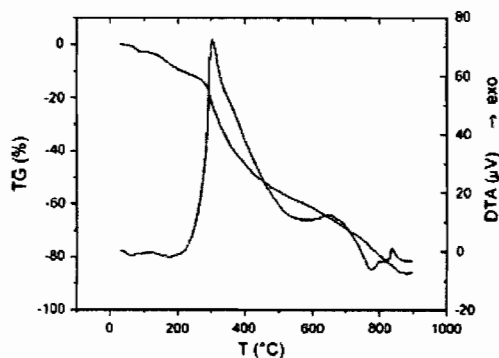
Compusul	C(%)		H(%)		N(%)		S(%)	
	Găsit	Calculat	Găsit	Calculat	Găsit	Calculat	Găsit	Calculat
$(\text{RuCl}_3(\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_4)_2(\text{C}_2\text{H}_6\text{OS})) \cdot (\text{C}_{59}\text{H}_{109}\text{O}_{40})$ Ru-oflo/HP $\beta$ CD	46.8	47.23	6.49	6.71	3.86	3.41	1.77	1.3
$(\text{RuCl}_3(\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_4)_2(\text{C}_2\text{H}_6\text{OS})) \cdot (\text{C}_{59}\text{H}_{109}\text{O}_{40})$ Ru-levo/HP $\beta$ CD	46.67	47.23	6.72	6.71	3.6	3.41	1.73	1.3
$(\text{RuCl}_3(\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}_3)_2(\text{C}_2\text{H}_6\text{OS})) \cdot (\text{C}_{59}\text{H}_{109}\text{O}_{40})$ Ru-nf/HP $\beta$ CD	45.76	45.53	6.1	6.35	3.91	3.50	1.81	1.34
$(\text{RuCl}_3(\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{FN}_3\text{O}_3)_2(\text{C}_2\text{H}_6\text{OS})) \cdot (\text{C}_{59}\text{H}_{109}\text{O}_{40})$ Ru-enro/HP $\beta$ CD	47.43	47.45	5.92	6.41	3.76	3.35	1.10	1.28
$(\text{RuCl}_3(\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_3)_2(\text{C}_2\text{H}_6\text{OS})) \cdot (\text{C}_{59}\text{H}_{109}\text{O}_{40})$ Ru-pip/HP $\beta$ CD	45.21	45.48	5.95	6.40	5.68	5.96	1.92	1.36

## EXEMPLUL 3

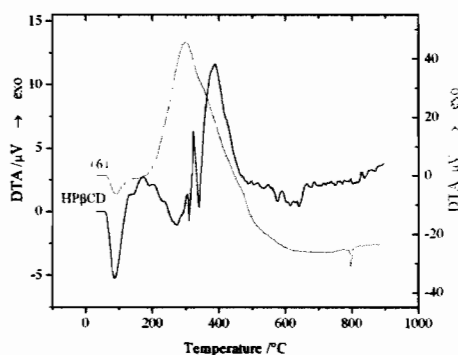
Caracterizarea complexelor  $[\text{RuCl}_3(\text{L})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{CD}$ 

**Analiza termică** Proprietățile termice ale complexelor  $[\text{RuCl}_3(\text{L})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{CD}$  au fost investigate prin analiză TG și DTA. DTA furnizează unele informații despre interacțiunile în stare solidă între ciclodextrină și moleculele oaspete.

Prezența interacțiunilor dintre HP- $\beta$ -CD și complexii Ru(III)-chinolone este confirmată de modificarea ușoară a alurii curbei ATD, cu reducerea drastică a intensității efectului termic și cu modificarea formei generale a picului exoterm caracteristic descompunerii complexului Ru(III)-chinolone. Se poate observa deplasarea temperaturii de declanșare a procesului de descompunere spre temperaturi mai mici cu aproximativ 10°C și dispariția picului exoterm caracteristic celei de-a doua etape de descompunere, de la 630°C:



Curbele TG, DTA pentru Ru-nf

Curbele DTA pentru HP- $\beta$ -CD și Ru-nf/HP $\beta$ CD (6)

**Spectre de absorbție în IR** Modificări ale formei, poziției și intensității picurilor de absorbție

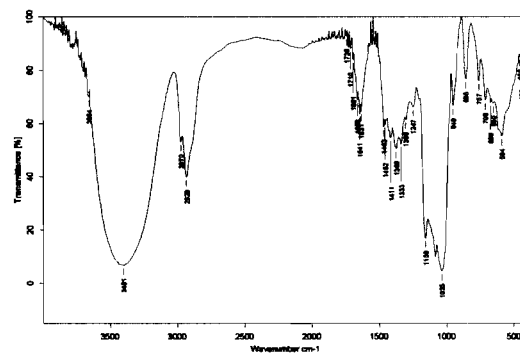
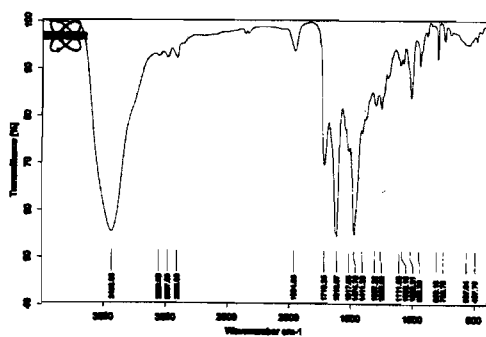
IR ale moleculei gazdă sau oaspete sau gazdă pot furniza informații pentru interacțiunea acestora.



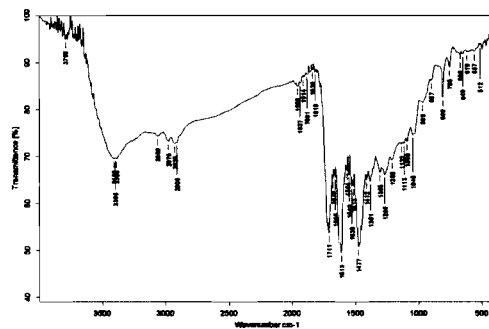
În cazul complexelor formați prin asocierea (2-hidroxipropil)- $\beta$ -ciclodextrinei cu complexul Ru(III) – fluorochinolone, interacțiunile sunt slabe, de tipul intercațiunilor hidrofobe, al forțelor de atracție sau repulsie etc., ceea ce face ca modificările apărute pe spectrele de absorbție în IR să se manifeste mai ales la nivelul intensității benzilor de absorbție și, într-o proporție mult mai mică, prin deplasări sau modificări ale formei benzilor de absorbție.

În spectrele de absorbție ale complexelor se regăsesc benzi de absorbție caracteristice chinolonei, cum sunt cele de la  $3400-3250\text{ cm}^{-1}$  și de la  $1650-1580\text{ cm}^{-1}$  (vibrațiilor de legătură N-H din gruparea imino (piperazinil)),  $1700-1690\text{ cm}^{-1}$  (C=O din gruparea carboxilică) și  $1050-1000\text{ cm}^{-1}$  (bandă intensă caracteristică legăturii C-F), dar sunt prezente și benzi caracteristice derivatului substituit de ciclodextrină,  $3401\text{ cm}^{-1}$  (O-H),  $2929\text{ cm}^{-1}$  (C-H),  $1156\text{ cm}^{-1}$  (C-O) și  $1035\text{ cm}^{-1}$  (O-C-O).

Așa cum reiese din spectrele de absorbție în IR, este posibil ca moleculele complexelor Ru(III)-chinolone să interacționeze cu ciclodextrinele prin nucleul piperazinil sau atomul de fluor din pozițiile 6 și, respectiv, 7.



Ru-nf

HP $\beta$ CDRu-nf/HP $\beta$ CD

Spectrele IR comparative ale Ru-nf, HP $\beta$ CD și complexului de asociere Ru-nf/HP $\beta$ CD

**EXEMPLUL 5**  
**Solubilitatea complexilor  $[\text{RuCl}_3(\text{L})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{CD}$**

Pentru determinarea solubilității, s-au cântărit probe de 2,50 mg complex, s-au adăugat 2,50 mL apă distilată, iar suspensiile obținute s-au agitat mecanic 24 h la temperatura camerei. Suspensiile au fost filtrate prin membrană filtrantă cu pori de  $0,45\mu\text{m}$  (celuloză regenerată) și soluțiile obținute au fost diluate corespunzător (1/25). După măsurarea absorbanțelor (martor = apă distilată) se calculează concentrația soluției saturate.

Tabel 2: Solubilitatea complexilor  $[\text{RuCl}_3(\text{L})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{CD}$

Cod	Complex	Lungime de undă (nm)	$\epsilon$ ( $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	Solubilitate (M)
4	Ru-oflo/HP $\beta$ CD	281,5	53071,16	$2,656\cdot 10^{-4}$
5	Ru-levo/HP $\beta$ CD	286	52404,61	$2,904\cdot 10^{-4}$
6	Ru-nf/HP $\beta$ CD	274,5	64449,62	$2,0928\cdot 10^{-4}$
7	Ru-enro/HP $\beta$ CD	274	76110,56	$1,5675\cdot 10^{-4}$
8	Ru-cp/HP $\beta$ CD	284,5	47817,54	$4,3673\cdot 10^{-4}$
9	Ru-cnox/HP $\beta$ CD	289,5	42743,84	$3,9668\cdot 10^{-4}$
10	Ru-pip/HP $\beta$ CD	270,5	55371,9	$1,1156\cdot 10^{-4}$

**EXEMPLUL 5**

**Acțiunea antitumorală a complexilor  $[\text{RuCl}_3(\text{L})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{CD}$  pe celule tumorale umane**

Experimentele comparative s-au efectuat pe linia celulară de adenocarcinom de colon uman LoVo. Pentru evaluarea efectului citotoxic a fost determinată viabilitatea prin metoda colorimetrică MTS, bazată pe reducerea bromurii de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliiu de către celulele viabile, cu formarea unui formazan, folosind ca martor pozitiv cisplatin.

Tabel 3: Efectul citotoxic al complexilor  $[\text{RuCl}_3(\text{L})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{CD}$  evaluat prin tehnica colorimetrică MTS

Substanta	Viabilitate (%)				
	200 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	12.5 $\mu\text{M}$
Ru-of/HP $\beta$ CD	71.11	85.4	89.87	95.65	97.17
Ru-levof/HP $\beta$ CD	75.62	82.55	87.46	91.33	95.25
Ru-nf/HP $\beta$ CD	79.57	87.29	91.58	93.73	98.84
Ru-enro/HP $\beta$ CD	43.49	78.25	81.59	91.51	94.29
Ru-cp/HP $\beta$ CD	43.49	75.08	90.63	96.43	99.92
Ru-enx/HP $\beta$ CD	43.49	78.25	90.40	103.33	94.29
Ru-pip/HP $\beta$ CD	43.49	75.08	90.63	96.43	99.92
Cisplatin	43.49	75.08	90.63	96.43	99.92

Comparativ cu cisplatin, compusul cel mai activ este Ru-cp/HP $\beta$ CD pentru toate concentrațiile studiate, urmat de Ru-enro/HP $\beta$ CD.

Evaluarea evenimentelor apoptotice s-a făcut prin tehnica dublei colorații cu Anexina-V/ PI (iodura de propidiu), urmată de achiziția și analiza datelor prin citometrie în flux, utilizând citometrul în flux FACSCantoII.

Tabel 4: Determinarea efectului antitumoral al complexilor  $[\text{RuCl}_3(\text{L})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{CD}$  prin evaluarea apoptozei în linia celulară de adenocarcinom de colon uman LoVo:

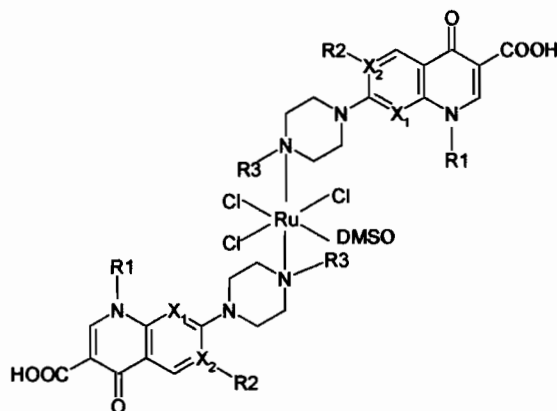
Compusul	Apoptoza timpurie (%)	Apoptoza târzie / secundară (%)	Apoptoza totală (%)
NT	6.89	9.11	16
Cis-Pt (10 $\mu\text{M}$ )	9.83	17.38	27.21
Cis-Pt (50 $\mu\text{M}$ )	15.22	22.31	37.53

<b>Ru-of/HP<math>\beta</math>CD (10 <math>\mu</math>M)</b>	<b>8.57</b>	<b>18.8</b>	<b>27.37</b>
<b>Ru-of/HP<math>\beta</math>CD (50 <math>\mu</math>M)</b>	<b>15.86</b>	<b>20.60</b>	<b>36.46</b>
<b>Ru-levof/HP<math>\beta</math>CD (10 <math>\mu</math>M)</b>	<b>9.70</b>	<b>22.67</b>	<b>32.37</b>
<b>Ru-levof/HP<math>\beta</math>CD (50 <math>\mu</math>M)</b>	<b>10.90</b>	<b>24.42</b>	<b>35.32</b>
<b>Ru-nf/HP<math>\beta</math>CD (10 <math>\mu</math>M)</b>	<b>16.7</b>	<b>22.71</b>	<b>39.41</b>
<b>Ru-nf/HP<math>\beta</math>CD (50 <math>\mu</math>M)</b>	<b>18.93</b>	<b>21.19</b>	<b>40.12</b>
<b>Ru-enro/HP<math>\beta</math>CD (10 <math>\mu</math>M)</b>	<b>63.28</b>	<b>1.95</b>	<b>65.23</b>
<b>Ru-enro/HP<math>\beta</math>CD (50 <math>\mu</math>M)</b>	<b>83.52</b>	<b>3.94</b>	<b>87.46</b>
<b>Ru-cp/HP<math>\beta</math>CD (10 <math>\mu</math>M)</b>	<b>65.90</b>	<b>3.37</b>	<b>69.27</b>
<b>Ru-cp/HP<math>\beta</math>CD (50 <math>\mu</math>M)</b>	<b>71.99</b>	<b>4.88</b>	<b>76.87</b>
<b>Ru-enx/HP<math>\beta</math>CD (10 <math>\mu</math>M)</b>	<b>75.00</b>	<b>3.59</b>	<b>78.59</b>
<b>Ru-enx/HP<math>\beta</math>CD (50 <math>\mu</math>M)</b>	<b>69.64</b>	<b>5.51</b>	<b>75.15</b>
<b>Ru-plp/HP<math>\beta</math>CD (10 <math>\mu</math>M)</b>	<b>58.24</b>	<b>12.57</b>	<b>70.81</b>
<b>Ru-plp/HP<math>\beta</math>CD (50 <math>\mu</math>M)</b>	<b>69.50</b>	<b>2.55</b>	<b>72.05</b>

Se observă procentele mari ale apoptozei timpurii și totale mai mari decât cele corespunzătoare cisplatin în cazul majorității complexșilor  $[\text{RuCl}_3(\text{L})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{CD}$ , confirmând acțiunea antitumorală intensă a acestora.

## REVENDICĂRI

1. Complex de asociere cu formula generală  $[\text{RuCl}_3(\text{L})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{CD}$ , unde complexul  $[\text{RuCl}_3(\text{L})_2(\text{DMSO})]$  are formula de structură:



în care X1 poate fi N sau CH, X2, poate fi N sau C, R1 poate fi C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>,  $\triangle$ , sau  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}_3$ , R2 poate fi H sau F, R3 poate fi H, CH<sub>3</sub> sau C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, iar HPβCD este (2-hidroxiopropil)-beta-cliclodextrina

2. Compus conform revendicării 1 în care pentru X1 = N, X2 = N, R1 = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R2 = -, R3 = H, complexul de asociere este  $[\text{RuCl}_3(\text{pip})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{CD}$ , (pip = acid pipemidic).

3. Compus conform revendicării 1 în care pentru X1 = N, X2 = C, R1 = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R2 = F, R3 = H, complexul de asociere este  $[\text{RuCl}_3(\text{enx})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{CD}$ , (enx = enoxacină).

4. Compus conform revendicării 1 în care pentru X1 = CH, X2 = C, R1 = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R2 = F, R3 = H, complexul de asociere este  $[\text{RuCl}_3(\text{nf})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{CD}$ , (nf = norfloxacină).

5. Compus conform revendicării 1 în care pentru X1 = CH, X2 = C, R1 =  $\triangle$ , R2 = F, R3 = H, complexul de asociere este  $[\text{RuCl}_3(\text{cp})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{CD}$ , (cp = ciprofloxacină).

6. Compus conform revendicării 1 în care pentru X1 = CH, X2 = C, R1 =  $\triangle$ , R2 = F, R3 = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, complexul de asociere este  $[\text{RuCl}_3(\text{enro})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{CD}$ , (enro = enrofloxacină).

7. Compus conform revendicării 1 în care pentru  $X1 = CH$ ,  $X2 = C$ ,  $R1 = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}$ ,  $R2 = F$ ,  $R3 = CH_3$ , complexul de asociere este  $[\text{RuCl}_3(\text{of})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{CD}$ , (of = ofloxacină).

8. Compus conform revendicării 1 în care pentru  $X1 = CH$ ,  $X2 = C$ ,  $R1 = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}$ ,  $R2 = F$ ,  $R3 = CH_3$ , complexul de asociere este  $[\text{RuCl}_3(\text{levof})_2(\text{DMSO})] \cdot \text{HP}\beta\text{CD}$ , (levof = levofloxacină).

9. Procedeu de preparare a compușilor de asociere prin adăugarea unei soluții apoase de ciclodextrină la o soluție slab alcalină de complex de ruteniu în raport molar 1:2 complex de ruteniu: ciclodextrină, urmată de neutralizare, filtrare și uscare.

10. Procedeu de preparare prin triturarea reactanților umectați cu puțină apă, în raport molar 1:1 complex de ruteniu: ciclodextrină, urmată de uscarea la  $60^\circ\text{C}$  până la pondere constantă și la utilizarea compușilor obținuți pentru acțiunea antitumorală.

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