



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2020 00446**

(22) Data de depozit: **27/07/2020**

(41) Data publicării cererii:  
**27/11/2020** BOPI nr. **11/2020**

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

(72) Inventatori:  
• **STECOZA CAMELIA ELENA, STR. MĂMULARI NR. 4, BL. C2, SC. 1, AP. 13, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **NIȚULESCU GEORGE MIHAI, ȘOS. OLTENIȚEI NR. 40-44, BL. 6A, SC. 4, ET. 7, AP. 145, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **MIHĂILĂ MIRELA ANTONELA, STR. BRAȘOV NR. 24, BL. 717, SC. B, ET. 1, AP. 41, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **BOSTAN MARINELA, STR. NUFERILOR, NR. 34, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **DRĂGHICI CONSTANTIN, BD. TIMIȘOARA NR. 49, BL. CC6, SC. A, ET. 2, AP. 7, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **CĂPROIU MIRON TEODOR, ALEEA BĂIUȚ NR. 13, BL. A 34, SC. A, ET. 3, AP. 12, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

*Această publicație include și modificările descrierii, revendicărilor și desenelor depuse conform art. 35 alin. (2) din HG nr. 547/2008*

(54) **DERIVAȚI DE 2-ARIL(HETEROARIL)-5-[2-(FENILTOMETILFENIL)-1,3,4-OXADIAZOL, COMPOZIȚIE FARMACEUTICĂ CE ÎI CONȚINE ȘI UTILIZAREA LOR CA AGENȚI ANTITUMORALI**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la derivați de 2-aril(heteroaril)-5-[2-(feniltometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol, o compoziție farmaceutică ce îi conține și utilizarea acestora ca agenți antitumorali. Derivații 1,3,4-oxadiazolici, conform invenției, au formula generală I, în care R este -H sau o grupare -CH<sub>3</sub>, X este S sau SO<sub>2</sub> și R' este o grupare aril nesubstituită, mono- sau polisubstituită cu radicali C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> alchil, halogen, -NO<sub>2</sub>, heteroaril cu 5-6 membri cu N, S, O.

Compoziția, conform invenției, conține ca unic principiu activ antitumoral un derivat, conform invenției, împreună cu excipienți acceptabili farmaceutic. Derivații cu formula generală I, conform invenției, sunt utilizați pentru prepararea unui medicament destinat tratamentului antitumoral.

Revendicări: 4

*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).*



51

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. .... a 2020 00546
Data depozit ..... 27 -07- 2020

**DERIVAȚI DE 2-ARIL(HETEROARIL)-5-[2-(FENILTOMETILFENIL)-1,3,4-  
OXADIAZOL, COMPOZIȚIE FARMACEUTICĂ CE ÎI CONȚINE ȘI UTILIZAREA  
LOR CA AGENȚI ANTITUMORALI**

Cancerul este o maladie datorată procesului de multiplicare dezordonată a unei celule care a scăpat de sub controlul mecanismelor de autoreglare ale organismului, înregistrându-se o abatere de la funcția pe care aceasta ar fi trebuit să o îndeplinească. Cancerul reprezintă o problemă importantă de sănătate la nivel mondial întrucât prevalența acestuia a crescut semnificativ în decursul timpului. Deși în ultimii ani s-au înregistrat progrese care au dus la schimbări majore în tratamentul diferitelor forme de cancer, principalele obstacole în succesul terapiei au rămas dezvoltarea rezistenței celulelor tumorale la diverșii agenți chimioterapici precum și imposibilitatea de eradicare a tuturor celulelor tumorale.

Răspunsul celulelor la chimioterapie depinde de caracteristicile de proliferare ale tumorii, astfel încât statusul proliferativ poate influența sensibilitatea la citostatice, având implicații terapeutice importante.

Chimioterapia antitumorală este încă limitată de lipsa selectivității medicamentelor și de efectele adverse ale acestora. Ca urmare, există un interes deosebit pentru conceperea de noi molecule antitumorale mai eficiente și mai puțin toxice. Studiile sunt orientate pentru obținerea de molecule originale, capabile să trateze cancerul și care să vizeze mecanisme moleculare cum ar fi semnalizarea celulară, apoptoza, transcripția genelor, angiogeneza etc.

În ultimii ani nucleul 1,3,4-oxadiazolic a stat la baza proiectării a numeroase molecule cu efect antitumoral [Akhtar J. și col., *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 125, 143-189; Bajaj S. și col., *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, 97, 124-141; Khanam R. și col., *J. Pharm. Anal.* **2019**, 9(2), 133-141].

Astfel, au fost sintetizați o serie de derivați 1,3,4-oxadiazolici 2,5-difenil-substituiți [Ullah H., și col., *Bioorg. Chem.*, **2018**, 78, 58–67; Tahaa M. și col., *Bioorg. Med. Chem.*, **2018**, 26, 3654–3663], respectiv 2,5- fenil/piridil- disubstituiți [Khan K.M. și col., *Med. Chem. Res.*, **2013**, 22(12), 6022-6028], cu acțiune antitumorală, care acționează ca inhibitori ai timidin-fosforilazei. Introducerea nucleului piridinic pe structura oxadiazolică a determinat intensificarea acțiunii inhibitorii.

Au fost sintetizați și testați o serie de derivați 1,3,4-oxadiazolici, care conțin un fragment benziltio legat de nucleul oxadiazolic. Compușii s-au dovedit activi ca agenți antitumorali prin diverse mecanisme moleculare: inhibarea telomerazei [Xiao-Min Z. și col.,

*Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, 19, 6518-6524], inhibarea kinazei de adeziune focală (FAK) [Shuai Z. și col., *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, 21, 3723-3729], inhibarea EGFR (receptorul factorului de creștere epidermal uman) [Liu K. și col., *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, 47, 473-478].

Alte studii realizate pe derivați 1,3,4-oxadiazolici 2-fenil-5-heteroaril-substituiți au descris efectul acestora asupra liniei celulare de cancer de sân MCF-7, evidențiind că aceștia acționează prin inducerea apoptozei celulare. Mecanismul de acțiune al acestor compuși are la bază stoparea ciclului celular în faza G2/M [Dofe V. S și col., *Res. Chem. Intermed.*, **2017**, 43(12), 7331-7345].

În acest fel, nucleul 1,3,4-oxadiazolic se remarcă datorită potențialului farmaceutic semnificativ al derivaților acestuia, ca agenți antitumorali prin mecanisme biochimice diferite [Glomb T., *Molecules*, **2018**, 23(12), 3361].

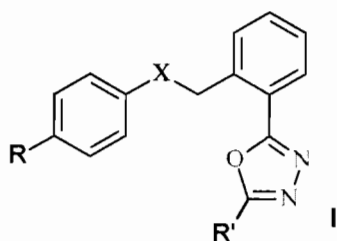
Pe de altă parte nucleul 1,3,4-oxadiazolic se regăsește în structura a numeroase medicamente cu acțiuni farmacologice variate, cum ar fi raltegravirul, medicament antiretroviral utilizat în tratamentul infecției HIV, oxolamina, medicament antitusiv, furamizolul, medicament antibacterian.

Necesitatea descoperirii de noi compuși antitumorali derivă și din faptul că la nivel global cancerul este una din cauzele majore de morbiditate și mortalitate, OMS avertizând că în următorii 20 de anii cazurile de cancer s-ar putea dubla, cancerul pulmonar, de sân și colorectal fiind cele mai frecvente.

Dezvoltarea unor molecule cu structură originală, eficiente și cu toxicitate scăzută, care să reprezinte soluții terapeutice eficiente în cazul fenomenului de rezistență la terapia antitumorală, constituie o direcție prioritară a cercetării de noi agenți antitumorali.

Problema pe care prezenta invenție o rezolvă constă în sinteza unor noi compuși cu toxicitate scăzută din clasa 1,3,4-oxadiazolilor care să prezinte acțiune antitumorală semnificativă. Soluția propusă în prezenta invenție constă într-o clasă de derivați de 2-aril(heteroaril)-5-[2-(feniltiometilfenil)-1,3,4-oxadiazol, cu formula generală **I** care prezintă acțiune citotoxică crescută, comparabilă sau superioară unor medicamente antitumorale de referință, cum sunt cisplatinul și doxorubicina.

Într-un aspect, invenția se referă la derivați de 2-aril(heteroaril)-5-[2-(feniltiometilfenil)-1,3,4-oxadiazol cu următoarea formulă generală **I**:



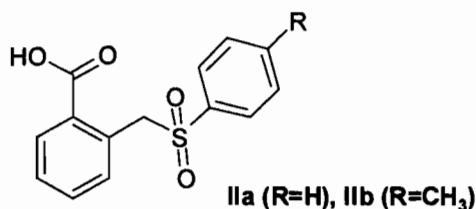
în care

R este -H sau o grupă -CH<sub>3</sub>

X este S sau SO<sub>2</sub> și

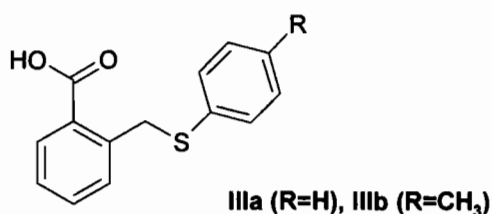
R' este aril nesubstituit, mono- sau polisubstituit cu radicali alchil C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, halogen, -NO<sub>2</sub>, heteroaril cu 5-6 membri cu N, S, O

Într-un alt aspect invenția se referă la un procedeu de obținere a acidului 2-[(fenilsulfonil)metil]-benzoic (**IIa**) și a acidului 2-[(4-metilfenil)sulfonilmetil]-benzoic (**IIb**), compuși intermediari în sinteza derivaților de 2-aryl(heteroaril)-5-[2-(feniltiometilfenil)-1,3,4-oxadiazol I,



procedeu care are loc în următoarele etape:

- a. reacția ftalidei cu tiofenolul, respectiv cu p-tiocrezolul, cu obținerea compușilor **IIIa** și **IIIb**

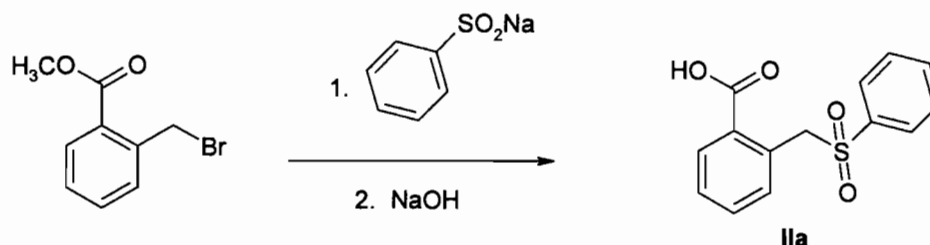


Prepararea acidului 2-(feniltiometil)-benzoic (**IIIa**) și a acidului 2-(p-toliltiometil)-benzoic (**IIIb**) este prezentată în următoarele articole:

1. Stecoza C.E. și col., *Rev. Chim. (București)*, **2011**, 62(6), 610-613
2. Sadek B, și col., *Sci.Pharm.*, **2011**, 79( 4), 749-761

- b. oxidarea compușilor **IIIa** și **IIIb** obținuți în etapa a, cu o soluție de peroxid de hidrogen 30%, în raport molar 1:10, în mediu de acid acetic glacial

Se cunoaște un procedeu de preparare a compușilor **II**, descris în literatură [Patra A. și col., *Synthesis*, **2006**, 15, 2556-2562], care constă în reacția bromometilbenzoatului de metil cu bezensulfinatul de sodiu în DMF la temperatura camerei, urmată de hidroliza esterului rezultat cu o soluție apoasă de hidroxid de sodiu:



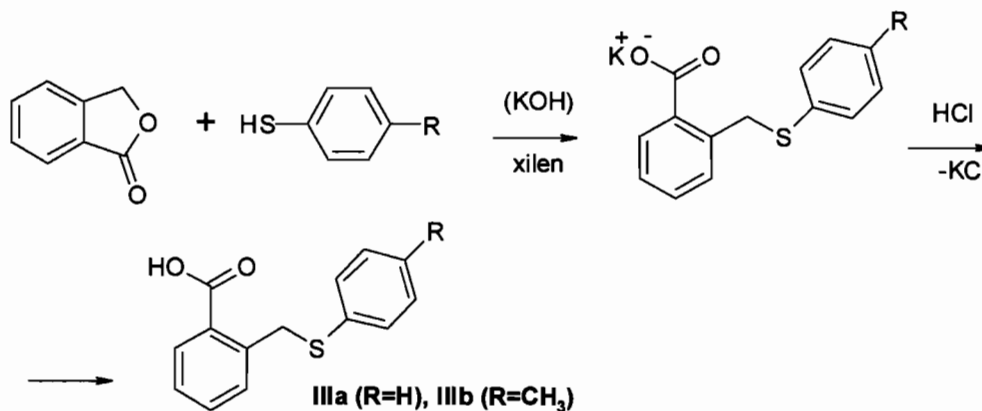
Avantajele de preparare a acizilor **IIa** și **IIb** prin noul procedeu, conform invenției sunt: randamentele mai mari de obținere, utilizarea unor reactanți mai puțin toxici, mai prietenoși cu mediul (ex. peroxidul de hidrogen).

Într-un alt aspect, invenția se referă la o compoziție farmaceutică, care conține, ca unic principiu activ antitumoral, un derivat de 2-aryl(heteroaryl)-5-[2-(feniltiometilfenil)-1,3,4-oxadiazol cu formula generală **I**, definit mai sus, împreună cu excipienții acceptabili farmaceutic.

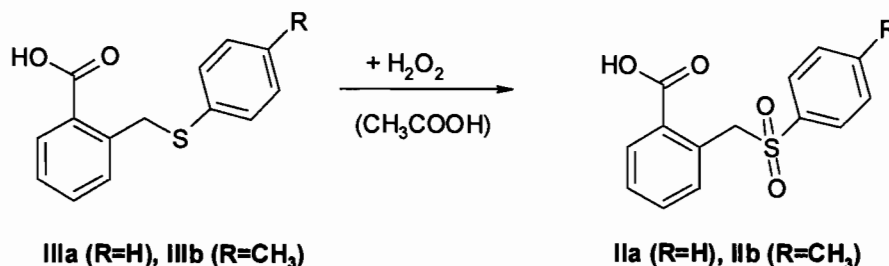
Într-un alt aspect, invenția se referă la utilizarea unui derivat de 2-aryl(heteroaryl)-5-[2-(feniltiometilfenil)-1,3,4-oxadiazol cu formula generală **I**, definit mai sus, pentru prepararea unui medicament destinat tratamentului antitumoral.

Procedeu de preparare a derivaților de 2-aryl(heteroaryl)-5-[2-(feniltiometilfenil)-1,3,4-oxadiazol **I** definiți ca mai sus, conform invenției, cuprinde următoarele etape:

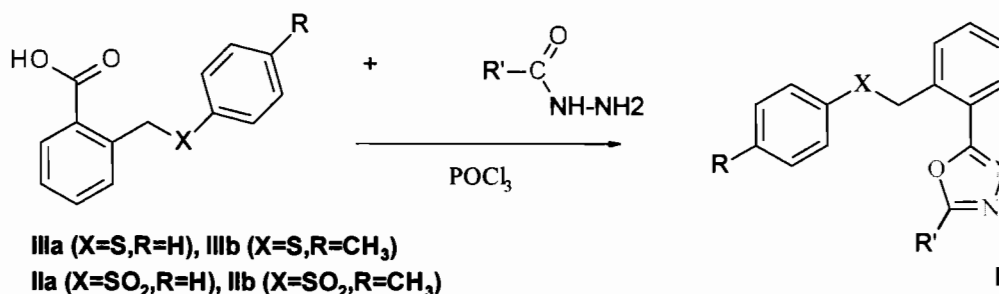
- a. Sinteza acidului 2-(feniltiometil)-benzoic (**IIIa**) și a acidului 2-(p-toliltiometil)-benzoic (**IIIb**) prin reacția ftalidei cu tiofenolul respectiv cu p-tiocrezolul. Intermediar se formează sărurile de potasiu ale acestor acizi, care sunt solubile în apă și pot fi separate de stratul organic prin tratare cu o soluție diluată de acid clorhidric



- b. Sinteza acidului 2-[(fenilsulfonil)metil]-benzoic (**IIa**) și a acidului 2-[(4-metilfenil)sulfonilmetil]-benzoic (**IIb**) prin oxidarea acizilor **IIIa** și **IIIb** obținuți în etapa a, cu o soluție de peroxid de hidrogen 30%, în raport molar 1:10, în mediu de acid acetic glacial, conform noului procedeu al invenției



- c. Sinteza noilor derivați de 2-aril(heteroaril)-5-[2-(feniltiometilfenil)-1,3,4-oxadiazol **I**] prin refluxarea acidului 2-(feniltiometil)-benzoic (**IIIa**), a acidului 2-(p-toliltiometil)-benzoic (**IIIb**), a acidului 2-[(fenilsulfonil)metil]-benzoic (**IIa**) sau a acidului 2-[(4-metilfenil)sulfonilmetil]-benzoic (**IIb**) cu diverse hidrazide ale unor acizi aromatici (heteroaromatici), în prezența oxiclorurii de fosfor



R, X și R' au semnificația prezentată anterior la formula generală a noilor compuși.

Procedeu de obținere a unor 1,3,4-oxadiazoli-2,5-disubstituiți printr-o reacție de ciclodeshidratare pornind de la diverse hidrazide și diverși acizi aromatici, în prezența oxiclorurii de fosfor este prezentat în literatură: Dofe V. S și col., *Res. Chem. Intermed.*, **2017**, 43(12), 7331-7345; Kumar H. și col., *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, 43(12), 2688-2698.

Avantajul derivaților de 2-aril(heteroaril)-5-[2-(feniltiometilfenil)-1,3,4-oxadiazol (**I**)] conform invenției constă în faptul că aceștia exercită o acțiune citotoxică crescută, asupra liniilor celulare umane de adenocarcinom mamar și adenocarcinom de colon, comparabilă sau superioară unor medicamente antitumorale de referință.

Avantajul de preparare a acizilor **IIa** și **IIb** prin noul procedeu, conform invenției sunt: randamentele mai mari de obținere, utilizarea unor reactanți mai puțin toxici, mai prietenoși cu mediul (ex. peroxidul de hidrogen).

Pentru dovedirea structurii noilor compuși s-a efectuat analiza spectrală și elementală. Spectrele  $^1\text{H}$ -RMN și  $^{13}\text{C}$ -RMN au fost înregistrate la 300 MHz, respectiv 75,075 MHz, folosind un aparat Varian Gemini 300BB, utilizând ca solvent cloroformul deuterat ( $\text{CDCl}_3$ ), iar ca standard intern tetrametilsilanul (TMS). Pentru atribuirea univocă a semnalelor s-au efectuat și experimente bi-dimensionale COSY și HETCOR.

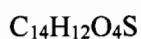
Analiza elementală s-a realizat cu un aparat Perkin Elmer CHNS/O Analyser Series II 2400. Temperaturile de topire au fost determinate cu un aparat Electrothermal 9100 și sunt necorectate.

Rezultatele obținute prin analiza spectrală și elementală confirmă structura noilor compuși conform invenției.

Se dau în cele ce urmează 7 exemple de realizare a invenției:

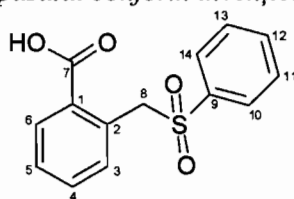
### Exemplul 1

*Sinteza acidului 2-[(fenilsulfonil)metil]-benzoic (IIa)*, compus intermediar obținut conform noului procedeu al invenției.



Într-un balon cu fund rotund, prevăzut cu refrigerent ascendent se solubilizează prin încălzire acidul 2-(feniltiometil)-benzoic (0,02 moli;  $M_r=244,30$ ) în 100 mL acid acetic glacial. Se adaugă treptat și sub agitare continuă 20 mL (0,2 moli;  $M_r=34,01$ ;  $d=1,11$ ) soluție de peroxid de hidrogen 30%, apoi amestecul de reacție se refluxează timp de 2 ore. Se răcește, se diluează cu apă și se extrage de mai multe ori cu cloroform. Soluțiile cloroformice reunite se anhidriază pe sulfat de sodiu, iar după îndepărtarea cloroformului prin distilare la presiune scăzută, produsul brut obținut se purifică prin recristalizare din alcool etilic. Se obțin 5,16 g compus ( $M_r=276,31$ ) (randament 93,5%), cristalin, alb cu P.t. = 154,3-155,3°C.

*Dovedirea structurii compusului conform invenției*



Analiza RMN:

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, J, Hz): 8.86 (sl, 1H, H-7); 8.05 (dd, 1H, H-6, 1.4, 7.5); 7.64 (dd, 2H, H-10, H-14, 1.4, 7.5); 7.59 (tt, 1H, H-12, 1.4, 7.2); 7.55 (td, 1H, H-4, 1.4, 7.5); 7.49 (m, 1H, H-5); 7.46 (m, 2H, H-11, H-13); 7.35 (dd, 1H, H-3, 1.4, 7.5); 5.10 (s, 2H, H-8)

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 171.88 (C-7); 137.90 (C-9); 129.97 (C-2); 129.45 (C-1); 129.04 (C-3); 128.98 (C-11, C-13); 128.62(C-10, C-14); 133.88(C-4 sau C-5); 133.74 (C-12); 133.02 (C-5 sau C-4); 131.86 (C-6); 59.46 (C-8)

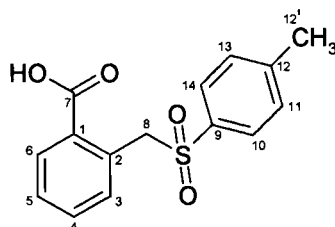
Analiza elementală: Teoretic C 60,86%, H 4,38%, S 11,60%. Experimental C 60,94%, H 4,28%, S 11,69%.

### Exemplul 2

Sinteza acidului 2-[(4-metilfenil)sulfonilmetil]-benzoic (**IIb**), compus intermediar obținut conform noului procedeu al invenției.



Într-un balon cu fund rotund, prevăzut cu refrigerent ascendent se solubilizează prin încălzire acidul 2-(p-toliltiometil)-benzoic (0,02 moli;  $M_r=258,34$ ) în 100 mL acid acetic glacial. Se adaugă treptat și sub agitare continuă 20 mL (0,2 moli;  $M_r=34,01$ ;  $d=1,11$ ) soluție de peroxid de hidrogen 30%, apoi amestecul de reacție se refluxează timp de 2 ore. Se răcește, se diluează cu apă și se extrage de mai multe ori cu cloroform. Soluțiile cloroformice reunite se anhidriază pe sulfat de sodiu, iar după îndepărtarea cloroformului prin distilare la presiune scăzută, produsul brut obținut se purifică prin recristalizare din alcool etilic. Rezultă 5,46 g compus ( $M_r=290,34$ ) (randament 94%), cristalin, alb cu P.t. = 192,3-193,1°C.



Analiza RMN:

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 8.03 (dd, 1H, H-6, 1.6, 7.7); 7.54 (td, 1H, H-4, 7.7, 1.6); 7.52 (d, 2H, H-10, H-14, 8.2); 7.47 (td, 1H, H-5, 7.7, 1.6); 7.34 (dd, 1H, H-3, 1.6, 7.7); 7.26 (d, 2H, H-11, H-13, 8.2); 5.07 (s, 2H, H-8); 2.39 (s, 3H, H-12')

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 171.40 (C-7); 144.89 (C-12); 135.03 (C-9); 133.69 (C-4 sau C-5); 132.92 (C-5 sau C-4); 131.75 (C-6); 129.96 (C-2); 129.96 (C-1); 129.58 (C-11, C-13); 128.96 (C-3); 128.64 (C-10, C-14); 59.61(C-8); 21.61 (C-12')

Analiza elementală: Teoretic C 62,05%, H 4,86%, S 11,04%. Experimental C 62,14%, H 4,80%, S 11,12%.

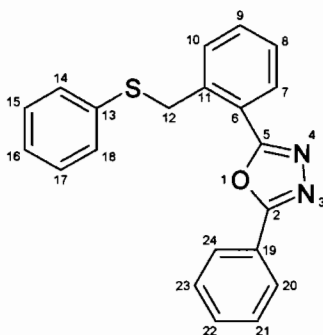
### Exemplul 3

Sinteza 2-fenil-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazolului (**Ia**)





Într-un balon cu fund rotund prevăzut cu refrigerent ascendent se dizolvă acidul 2-(feniltimetil)-benzoic (0,01 moli;  $M_r=244,3$ ) și benzoilhidrazina (0,01 moli;  $M_r=136,15$ ) în 45 mL oxiclură de fosfor și se refluxează timp de 9 ore. După răcire, amestecul de reacție se toarnă în gheață, apoi se lasă în repaus timp de 24 de ore. Precipitatul format se izolează prin filtrare la presiune scăzută, spălându-se pe hârtia de filtru până când apele de spălare au pH neutru. Produsul brut astfel rezultat se purifică prin recristalizare din alcool etilic. Rezultă 2,37 g compus ( $M_r=344,44$ ) (randament 69%), cristalin, alb cu cu P.t. 111,5-112°C.



#### Analiza RMN:

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 8,03 (dd, 7,7, 1,6, 2H, H-20, H-24); 7,95 (ddd, 1H, H-7); 7,42-7,49 m (3H, H-21, H-22, H-23); 7,27-7,35 m (3H; H-8, H-9, H-10); 7,22 td (2H, H-14, H-18); 7,07-7,15 m (3H, H-15, H-16, H-17); 4,64 (s, 2H, H-12)

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 164,39 (C-2(5)); 164,26 (C-5(2)); 138,07 (Cq); 135,60 (Cq); 131,90 (CH); 131,61 (2CH); 131,44 (CH); 131,39 (CH); 129,51 (CH); 129,23 (2CH); 128,90 (2CH); 127,75 (CH); 127,13 (2CH); 127,02 (CH); 123,97 (CH); 122,84 (CH); 38,30 (C-12)

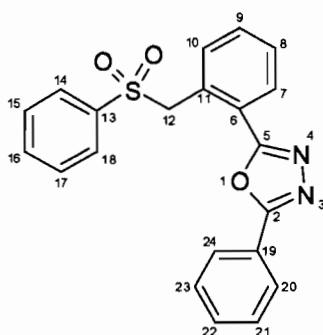
Analiza elementală: Teoretic C 73,23%, H 4,68%, N 8,13%, S 9,31%. Experimental C 73,31%, H 4,60%, N 8,20%, S 9,24%.

#### Exemplul 4

##### Sinteza 2-fenil-5-[2-(fenilsulfonilmetil)fenil]-1,3,4-oxadiazolului (Ib)

$\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$

Într-un balon cu fund rotund prevăzut cu refrigerent ascendent se dizolvă acidul 2-[(fenilsulfonil)metil]-benzoic (0,01 moli;  $M_r=276,31$ ) și benzoilhidrazina (0,01 moli;  $M_r=136,15$ ) în 45 mL oxiclură de fosfor și se refluxează timp de 9 ore. După răcire, amestecul de reacție se toarnă în gheață, apoi se lasă în repaus timp de 24 de ore. Precipitatul format se izolează prin filtrare la presiune scăzută, spălându-se pe hârtia de filtru până când apele de spălare au pH neutru. Produsul brut astfel rezultat se purifică prin recristalizare din alcool etilic. Rezultă 2,23 g compus ( $M_r=376,44$ ) (randament 59,2%), cristalin, alb cu cu P.t. 194,8-196,1°C.

**Analiza RMN:**

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm  $J$  Hz): 7,97 (dd, 8,0, 2.4, 2H, H-14, H-18); 7,77 (dd, 7.1, 1.8, 1H, H-7); 7,00-7,60 (m, 11H, H-arom); 5,26 (s, 2H, H-12)

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 164,05 (C-2(5)); 163,46 (C-5(2)); 138,07 (Cq); 134,03 (CH); 133,48 (CH); 132,09 (CH); 131,60 (CH); 129,46 (CH); 129,27 (2CH); 129,09 (CH); 128,87 (CH); 128,72 (2CH); 128,69 (CH); 127,99 (Cq); 127,02 (2CH); 124,37 (Cq); 123,53 (Cq); 59,38 (C-12)

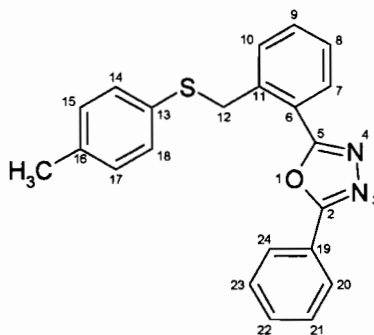
Analiza elementală: Teoretic C 67,01%, H 4,28%, N 7,44%, S 8,52%. Experimental C 67,09%, H 4,19%, N 7,38%, S 8,60%.

**Exemplul 5**

Sinteza 2-fenil-5-[2-(p-tolil-tiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazolului (Ic)

$\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{OS}$

Într-un balon cu fund rotund prevăzut cu refrigerent ascendent se dizolvă acidul 2-(p-toliltiometil)-benzoic (0,01 moli;  $M_r=258,34$ ) și benzoilhidrazina (0,01 moli;  $M_r=136,15$ ) în 45 mL oxiclură de fosfor și se refluxează timp de 9 ore. După răcire, amestecul de reacție se toarnă în gheață, apoi se lasă în repaus timp de 24 de ore. Precipitatul format se izolează prin filtrare la presiune scăzută, spălându-se pe hârtia de filtru până când apele de spălare au pH neutru. Produsul brut astfel rezultat se purifică prin recristalizare din alcool etilic. Rezultă 2,43 compus ( $M_r=358,47$ ) (randament 68%), cristalin, alb cu cu P.t. 115,6-116,81°C.

**Analiza RMN:**

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm  $J$  Hz): 8,11 (dd, 7,4, 1,5, 2H, H-20, H-24); 8,01 (dd, 7,0, 2,2, 1H, H-7); 7,48-7,58 (m, 3H, H-8, H-9, H-10); 7,40 (t, 6,5, 2H, H-21, H-23); 7,31 (t, 6,5, 1H, H-22); 7,17 (d, 8,1, 2H, H-15, H-17); 6,98 (d, 8,1, 2H, H-14, H-18); 4,66 (s, 2H, H-12); 2,22 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ )

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 164,21 (C-2(5)); 164,16 (C-5(2)); 138,32 (Cq); 137,20 (Cq); 137,19 (Cq); 132,38 (CH); 132,28 (CH); 131,73 (CH); 131,34 (CH); 131,21 (CH); 129,51 (2CH); 129,32 (CH); 129,07 (2CH); 127,49 (CH); 126,96 (2CH); 123,83 (Cq); 122,64 (Cq); 38,70 (C-12); 21,01 ( $\text{CH}_3$ )

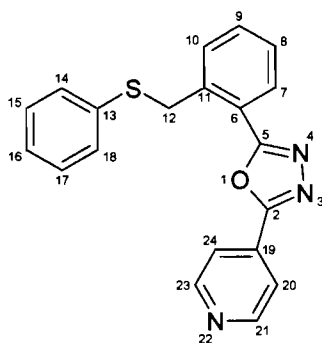
Analiza elementală: Teoretic C 73,72%, H 5,06%, N 7,81%, S 8,94%. Experimental C 73,81%, H 4,98%, N 7,72%, S 9,01%.

### Exemplul 6

*Sinteza 2-(4-piridil)-5-[2-(feniltiometil) fenil]-1,3,4-oxadiazolului (Id)*

$\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{OS}$

Într-un balon cu fund rotund prevăzut cu refrigerent ascendent se dizolvă acidul 2-(feniltiometil)-benzoic (0,01 moli;  $M_r=244,3$ ) și hidrazida acidului izonicotinic (0,01 moli;  $M_r=137,14$ ) în 45 mL oxiclorură de fosfor și se refluxează timp de 9 ore. După răcire, amestecul de reacție se toarnă în gheață, apoi se lasă în repaus timp de 24 de ore. Precipitatul format se izolează prin filtrare la presiune scăzută, spălându-se pe hârtia de filtru până când apele de spălare au pH neutru. Produsul brut astfel rezultat se purifică prin recristalizare din alcool izopropilic. Rezultă 2,42g compus ( $M_r=345,43$ ) (randament 70%), cristalin, alb cu cu P.t. 130,4- 131,8.°C.



Analiza RMN:

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{DMSO}+\text{CDCl}_3$  3:1,  $\delta$  ppm  $J$  Hz): 8,84 (d, 5,8, 2H, H-21, H-23); 8,07 (td, 4,0, 2,0, 1H, H-7); 8,03 (d, 5,8, 2H, H-20, H-24); 7,39-7,49 (m, 3H, H-8, H-9, H-10); 7,13-7,26 (m, 5H, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18); 4,71 (s, 2H, H-12)

<sup>13</sup>C-RMN (DMSO+CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 164, 50 (C-2(5)); 161,87 (C-5(2)); 149,90 (C-21, C-23); 137,56 (Cq); 135, 07 (Cq); 131,63 (CH); 131,14 (CH); 131,03 (CH); 129, 97 (2CH); 129,50 (CH); 128,64 (2CH); 127,73 (CH); 126,37 (CH); 121,70 (CH); 120, 41 (2CH); 36,54 (C-12)  
Analiza elementală: Teoretic C 69,54%, H 4,38%, N 12,16%, S 9,28%. Experimental C 69,48%, H 4,46%, N 12,26%, S 9,19%.

### **Exemplul 7**

#### *Evaluarea potențialului antitumoral al derivaților 1,3,4-oxadiazolici I*

Acțiunea antitumorală s-a realizat pe material biologic reprezentat de linii celulare standardizate, obținute din bănci internaționale de celule ("European Collection of Authenticated Cell Cultures" - ECACC), derivate din adenocarcinom uman de colon (linia celulară HT-29) și adenocarcinom uman de sân (liniile celulare MDA-MB 231 și MCF-7).

Citotoxicitatea derivaților 2-aril(heteroaril)-5-[2-(feniltiometilfenil)]-1,3,4-oxadiazolici I s-a realizat prin metoda colorimetrică MTS, comparativ cu cisplatinul (Cis-Pt) pentru linia celulară HT-29 și comparativ cu doxorubicina (DOX) pentru liniile celulare MDA-MB 231 și MCF-7.

Linia celulară HT-29 a fost izolată din tumora primară a unei paciente de 44 de ani de rasă caucaziană cu adenocarcinom de colon. Este o linie aderentă și prezintă morfologie de tip epitelial. Gena TP53 prezintă o mutație punctiformă G→A în codonul 273.

Linia celulară MCF-7 este o linie de adenocarcinom mamar izolată din lichidul pleural al unei paciente de rasă caucaziană de 69 de ani cu carcinom invaziv ductal mamar. Este o linie aderentă și prezintă morfologie de tip epitelial. Linia a reținut câteva caracteristici ale epiteliului mamar diferențiat. Nu prezintă mutații în TP53 (w/t).

Linia celulară MDA-MB-231 este o linie de adenocarcinom mamar izolată din lichidul pleural al unei paciente de rasă caucaziană de 51 de ani cu carcinom invaziv ductal mamar. Este o linie aderentă și prezintă morfologie de tip epitelial. Prezintă mutații în TP53.

#### *Principiul metodei*

Celulele au fost menținute în plăci de cultură în mediu DMEM / F12 suplimentat cu 2 mM L-glutamină, 10% ser fetal de vițel, 100 UI / mL penicilină, 100 μg / mL streptomicină și incubate în condiții standard de 37°C și atmosferă umedă cu 5% CO<sub>2</sub>. După 24 h celulele aderente au fost tratate cu diferite concentrații ale compușilor pentru 24 h. Tratamentele cu Cis-Pt și cei patru derivați s-au realizat folosind concentrații de 200 μM; 100 μM; 50 μM; 25 μM; 12,5 μM și 6,25 μM, iar tratamentul cu doxorubicină s-a efectuat cu concentrații de 20μM; 10 μM; 5 μM; 2,5 μM; 1,25 μM și 0,625 μM. S-au pregătit soluțiile stoc în DMSO și

au fost păstrate la -20°C. Concentrații de lucru ale compușilor au fost preparate în stocurile din mediu de cultură înainte de fiecare experiment.

Citotoxicitatea compușilor utilizați în experimente a fost testată cu ajutorul kitului CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega). Această metodă este rapidă și eficientă și poate fi utilizată pentru determinarea numărului de celule viabile aflate în proces de proliferare, în analiza efectului citotoxic indus de agenți terapeutici, precum și la determinarea procesului de adeziune celulară sau de chemotaxie.

Metoda se bazează pe capacitatea celulelor active metabolic de a reduce sarea galbenă de tetrazoliu la formazan colorat, solubil în mediu de cultură a celulelor. Kitul conține compusul tetrazolic MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfafenil)-2H-tetrazolium și reactivul PES (etosulfat de fenazină), cu ajutorul căruia MTS formează o soluție stabilă. Cantitatea de formazan produsă este măsurată prin citirea absorbției la lungimea de undă  $\lambda = 490$  nm și este direct proporțională cu numărul celulelor viabile din cultură.

Rezultatele obținute la evaluarea efectului citotoxic al derivaților 1,3,4-oxadiazolici I prin tehnica colorimetrică MTS, sunt prezentate în tabelele 1-3.

Procentul de viabilitate comparativ cu celulele netratate (considerate viabile 100%) a fost calculat după formula: Viabilitatea celulară (%) = (absorbția celulelor tratate - absorbția mediului de cultură) / (absorbția celulelor netratate - absorbția mediului de cultură)  $\times$  100.

Cele trei linii tumorale folosite pentru experimente au fost tratate, pentru 24 h, în triplicat, cu cei patru compuși sintetizați și cu cei doi agenți oncolitici utilizați în chimioterapie (Cis-Pt și DOX). Viabilitatea celulelor a fost exprimată ca valoare medie  $\pm$  abaterea standard (SD) a experimentelor.

*Tabelul 1*

*Rezultatele viabilității celulare la 24 de ore în testarea pe linia celulară HT-29*

Substanță	Viabilitate (%)					
	200 $\mu$ M	100 $\mu$ M	50 $\mu$ M	25 $\mu$ M	12,5 $\mu$ M	6,25 $\mu$ M
01BH	62,22 $\pm$ 2,52	63,44 $\pm$ 1,09	66,18 $\pm$ 0,61	68,01 $\pm$ 0,03	69,07 $\pm$ 0,94	71,76 $\pm$ 0,48
01BHO2	54,62 $\pm$ 2,78	57,56 $\pm$ 2,67	61,49 $\pm$ 3,02	62,42 $\pm$ 0,80	64,02 $\pm$ 0,61	67,21 $\pm$ 1,18
02BH	61,63 $\pm$ 0,66	64,95 $\pm$ 1,49	68,09 $\pm$ 0,96	69,10 $\pm$ 2,84	69,58 $\pm$ 0,35	70,94 $\pm$ 0,48
01HIN	61,16 $\pm$ 1,69	62,54 $\pm$ 4,24	64,28 $\pm$ 1,92	66,17 $\pm$ 0,09	68,30 $\pm$ 0,38	69,36 $\pm$ 0,34
Cis-Pt	57,66 $\pm$ 1,20	67,47 $\pm$ 1,23	73,34 $\pm$ 0,37	84,09 $\pm$ 0,46	88,73 $\pm$ 0,55	91,52 $\pm$ 1,42

Tabelul 2

Rezultatele viabilității celulare la 24 de ore în testarea pe linia celulară MDA-MB 231

Substanță	Viabilitate (%)					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
01BH	42,16±1,72	45,42±0,47	46,71±0,97	48,03±0,94	52,26±0,45	53,64±1,20
01BHO2	34,97±0,55	39,66±1,58	40,84±0,79	43,41±0,30	50,07±0,88	52,27±1,03
02BH	36,54±1,12	45,61±0,79	53,07±0,54	55,98±0,99	56,09±0,90	57,31±1,23
01HIN	15,90±0,52	21,70±1,03	23,82±1,12	32,70±0,47	39,91±0,64	44,16±0,45
DOX	56,93±0,04	64,29±2,08	66,70±1,15	77,60±0,44	81,78±0,67	84,43±0,67

Pentru compușii 01BH, 01BHO2, 02BH și 01HIN s-au folosit diluții seriale de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, începând de la concentrația de 200  $\mu$ M, iar pentru DOX s-au folosit diluții seriale de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, începând de la concentrația de 20  $\mu$ M.

Tabelul 3

Rezultatele viabilității celulare la 24 de ore în testarea pe linia celulară MCF-7

Substanță	Viabilitate (%)					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
01BH	43,19±2,69	51,60±1,77	52,60±1,61	53,48±1,15	56,26±1,57	58,88±0,30
01BHO2	46,90±0,35	54,35±0,56	55,99±0,67	57,32±0,66	58,80±0,28	59,18±0,48
02BH	55,89±1,54	57,31±1,77	60,46±0,38	61,55±2,40	62,75±1,44	67,69±0,07
01HIN	46,14±2,22	53,32±2,43	55,28±0,82	57,89±1,66	58,77±0,99	59,15±0,60
DOX	57,52±1,77	58,07±1,01	59,78±0,62	61,14±0,53	62,60±0,25	64,10±0,14

Pentru compușii 01BH, 01BHO2, 02BH și 01HIN s-au folosit diluții seriale de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, începând de la concentrația de 200  $\mu$ M, iar pentru DOX s-au folosit diluții seriale de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, începând de la concentrația de 20  $\mu$ M,

În urma tratamentului cu derivații 1,3,4-oxadiazolici I și cu cele două citostatice (Cis-Pt și DOX), pe cele trei linii luate în studiu, se observă că efectul antitumoral este dependent de doză, scăderea viabilității celulare fiind direct proporțională cu creșterea concentrației compușilor. Inhibarea proliferării celulare s-a făcut în funcție de tipul de tratament și de concentrațiile utilizate.

Procentul de viabilitate în cazul tratamentelor pe linia celulară de adenocarcinom de colon HT-29 este mai mic, comparativ cu cisplatin, la concentrațiile folosite între 6,25 $\mu$ M și 100 $\mu$ M, ceea ce conduce la concluzia că acești compuși sunt mai activi decât citostaticul. Expunerea acestei linii celulare la derivatul 01BHO2 în concentrație 50 $\mu$ M, timp de 24h, a

condus la o scădere importantă a viabilității (61,49%), comparativ cu cisplatinul (73,34%) (tabelul 1).

Linia tumorală MDA-MB 231 este cea mai sensibilă la tratamentul cu compuși sintetizați, obținându-se valori scăzute ale viabilității pentru toți cei patru derivați. De exemplu, în cazul expunerii acestei linii celulare la derivatul 01BH în concentrație 50 $\mu$ M, timp de 24h, procentul de viabilitate celulară este mai redus (46,71%), comparativ cu procentul de viabilitate în cazul celorlalte două linii celulare: 66,18% pentru linia celulară HT-29 și 52,60% pentru linia celulară MCF-7 (tabelele 1-3).

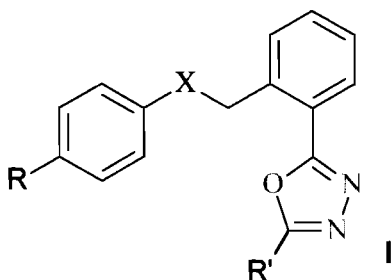
În urma evaluării potențialului antitumoral pe linia celulară de adenocarcinom mamar MDA-MB 231, se observă în cazul derivatului 01HIN o scădere semnificativă a viabilității la toate concentrațiile utilizate, acesta fiind cel mai activ dintre cei patru derivați. Prin expunerea acestei linii celulare la derivatul 01HIN în concentrație 50  $\mu$ M, timp de 24h, procentul de viabilitate celulară este de 23,82%. Viabilitatea se reduce la 21,70%, odată cu creșterea concentrației la 100  $\mu$ M. (tabelul 2). Se remarcă astfel că introducerea unui nucleu piridinic pe structura 1,3,4-oxadiazolică a determinat o scădere accentuată a procesului de proliferare în cazul celulelor de adenocarcinom mamar MDA-MB 231.

Și în cazul tratamentelor pe linia celulară de adenocarcinom mamar MCF-7, procentul de viabilitate este redus și scade odată cu creșterea concentrației, în cazul expunerii acestei linii celulare la derivatul 01BH în concentrație 50 $\mu$ M, timp de 24h, procentul de viabilitate fiind de 52,60% (tabelul 3).

În determinările efectuate pe liniile tumorale MDA-MB 231 și MCF-7 doxorubicina a fost folosită ca și control pozitiv, aceasta fiind unul dintre cei mai activi agenți anticanceroși.

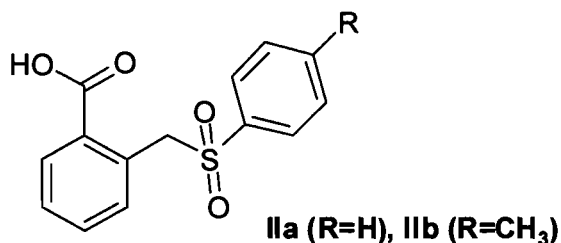
## REVENDICĂRI

1. Derivați de 2-aril(heteroaril)-5-[2-(feniltiometilfenil)-1,3,4-oxadiazol cu formula generală I:

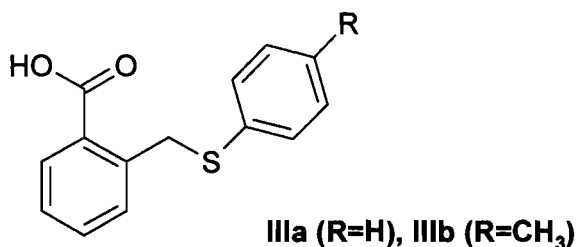


**caracterizați prin aceea că** R este -H sau o grupă -CH<sub>3</sub>, X este S sau SO<sub>2</sub> și R' este aril nesubstituit, mono- sau polisubstituit cu radicali alchil C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, halogen, -NO<sub>2</sub>, heteroaril cu 5-6 membri cu N, S, O

2. Procedeu de preparare a acidului 2-[(fenilsulfonil)metil]-benzoic (**IIa**) și a acidului 2-[(4-metilfenil)sulfonilmetil]-benzoic (**IIb**), **caracterizat prin aceea că** are loc în următoarele etape:



a. reacția ftalidei cu tiofenolul, respectiv cu p-tiocrezolul, cu obținerea compușilor **IIIa** și **IIIb**



b. oxidarea compușilor **IIIa** și **IIIb** obținuți în etapa a, cu o soluție de peroxid de hidrogen 30%, în raport molar 1:10, în mediu de acid acetic glacial



3. Compoziție farmaceutică, **caracterizată prin aceea că** aceasta conține, ca unic principiu activ antitumoral, un derivat de 2-aril(heteroaril)-5-[2-(feniltiometilfenil)-1,3,4-oxadiazol cu formula generală **I**, definit în revendicarea 1, împreună cu excipienți acceptabili farmaceutic.

4. Utilizarea unui derivat de 2-aril(heteroaril)-5-[2-(feniltiometilfenil)-1,3,4-oxadiazol cu formula generală **I**, definit în revendicarea 1, pentru prepararea unui medicament destinat tratamentului antitumoral.

**DERIVAȚI DE 2-ARIL(HETEROARIL)-5-[2-(FENILTOMETIL)FENIL]-1,3,4-  
OXADIAZOL, COMPOZIȚIE FARMACEUTICĂ CE ÎI CONȚINE ȘI UTILIZAREA  
LOR CA AGENȚI ANTITUMORALI**

Cancerul este o maladie datorată procesului de multiplicare dezordonată a unei celule care a scăpat de sub controlul mecanismelor de autoreglare ale organismului, înregistrându-se o abatere de la funcția pe care aceasta ar fi trebuit să o îndeplinească. Cancerul reprezintă o problemă importantă de sănătate la nivel mondial întrucât prevalența acestuia a crescut semnificativ în decursul timpului. Deși în ultimii ani s-au înregistrat progrese care au dus la schimbări majore în tratamentul diferitelor forme de cancer, principalele obstacole în succesul terapiei au rămas dezvoltarea rezistenței celulelor tumorale la diverșii agenți chimioterapici precum și imposibilitatea de eradicare a tuturor celulelor tumorale.

Răspunsul celulelor la chimioterapie depinde de caracteristicile de proliferare ale tumorii, astfel încât statusul proliferativ poate influența sensibilitatea la citostatice, având implicații terapeutice importante.

Chimioterapia antitumorală este încă limitată de lipsa selectivității medicamentelor și de efectele adverse ale acestora. Ca urmare, există un interes deosebit pentru conceperea de noi molecule antitumorale mai eficiente și mai puțin toxice. Studiile sunt orientate pentru obținerea de molecule originale, capabile să trateze cancerul și care să vizeze mecanisme moleculare cum ar fi semnalizarea celulară, apoptoza, transcripția genelor, angiogeneza etc.

În ultimii ani nucleul 1,3,4-oxadiazolic a stat la baza proiectării a numeroase molecule cu efect antitumoral [Akhtar J. și col., *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 125, 143-189; Bajaj S. și col., *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, 97, 124-141; Khanam R. și col., *J. Pharm. Anal.* **2019**, 9(2), 133-141].

Astfel, au fost sintetizați o serie de derivați 1,3,4-oxadiazolici 2,5-difenil-substituiți [Ullah H., și col., *Bioorg. Chem.*, **2018**, 78, 58-67; Tahaa M. și col., *Bioorg. Med. Chem.*, **2018**, 26, 3654-3663], respectiv 2,5-fenil/piridil-disubstituiți [Khan K.M. și col., *Med. Chem. Res.*, **2013**, 22(12), 6022-6028], cu acțiune antitumorală, care acționează ca inhibitori ai timidin-fosforilazei. Introducerea nucleului piridinic pe structura oxadiazolică a determinat intensificarea acțiunii inhibitorii.

Au fost sintetizați și testați o serie de derivați 1,3,4-oxadiazolici, care conțin un fragment benziltio legat de nucleul oxadiazolic. Compușii s-au dovedit activi ca agenți antitumorali prin diverse mecanisme moleculare: inhibarea telomerazei [Xiao-Min Z. și col.,

*Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, 19, 6518-6524], inhibarea kinazei de adeziune focală (FAK) [Shuai Z. și col., *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, 21, 3723-3729], inhibarea EGFR (receptorul factorului de creștere epidermal uman) [Liu K. și col., *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, 47, 473-478].

Alte studii realizate pe derivați 1,3,4-oxadiazolici 2-fenil-5-heteroaril-substituiți au descris efectul acestora asupra liniei celulare de cancer de sân MCF-7, evidențiind că aceștia acționează prin inducerea apoptozei celulare. Mecanismul de acțiune al acestor compuși are la bază stoparea ciclului celular în faza G2/M [Dofe V. S și col., *Res. Chem. Intermed.*, **2017**, 43(12), 7331-7345].

În acest fel, nucleul 1,3,4-oxadiazolic se remarcă datorită potențialului farmaceutic semnificativ al derivaților acestuia, ca agenți antitumorali prin mecanisme biochimice diferite [Glomb T., *Molecules*, **2018**, 23(12), 3361].

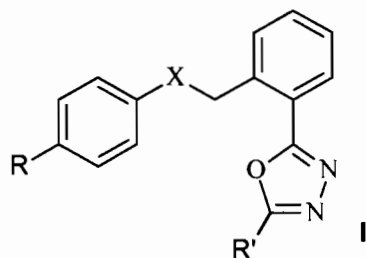
Pe de altă parte nucleul 1,3,4-oxadiazolic se regăsește în structura a numeroase medicamente cu acțiuni farmacologice variate, cum ar fi raltegravirul, medicament antiretroviral utilizat în tratamentul infecției HIV, oxolamina, medicament antitusiv, furamizolul, medicament antibacterian.

Necesitatea descoperirii de noi compuși antitumorali derivă și din faptul că la nivel global cancerul este una din cauzele majore de morbiditate și mortalitate, OMS avertizând că în următorii 20 de anii cazurile de cancer s-ar putea dubla, cancerul pulmonar, de sân și colorectal fiind cele mai frecvente.

Dezvoltarea unor molecule cu structură originală, eficiente și cu toxicitate scăzută, care să reprezinte soluții terapeutice eficiente în cazul fenomenului de rezistență la terapia antitumorală, constituie o direcție prioritară a cercetării de noi agenți antitumorali.

Problema pe care prezenta invenție o rezolvă constă în sinteza unor noi compuși cu toxicitate scăzută din clasa 1,3,4-oxadiazolilor care să prezinte acțiune antitumorală semnificativă. Soluția propusă în prezenta invenție constă într-o clasă de derivați de 2-aril(heteroaril)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol, cu formula generală I care prezintă acțiune citotoxică crescută, comparabilă sau superioară unor medicamente antitumorale de referință, cum sunt cisplatinul și doxorubicina.

Într-un aspect, invenția se referă la derivați de 2-aril(heteroaril)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol cu următoarea formulă generală I:



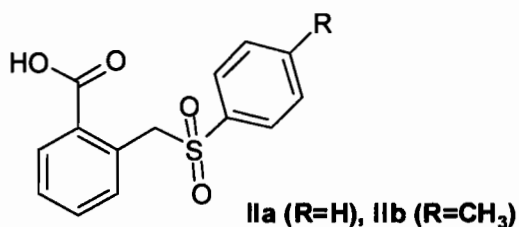
în care

R este -H sau o grupă -CH<sub>3</sub>

X este S sau SO<sub>2</sub> și

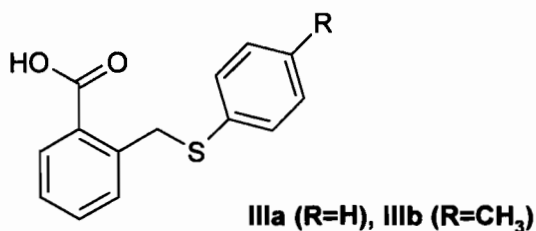
R' este aril nesubstituit, mono- sau polisubstituit cu radicali alchil C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, halogen, -NO<sub>2</sub>, heteroaril cu 5-6 membri cu N, S, O

Într-un alt aspect invenția se referă la un procedeu de obținere a acidului 2-[(fenilsulfonil)metil]-benzoic (**IIa**) și a acidului 2-[(4-metilfenil)sulfonilmetil]-benzoic (**IIb**), compuși intermediari în sinteza derivaților de 2-aril(heteroaril)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol **I**,



procedeu care are loc în următoarele etape:

- a. reacția ftalidei cu tiofenolul, respectiv cu p-tiocrezolul, cu obținerea compușilor **IIIa** și **IIIb**

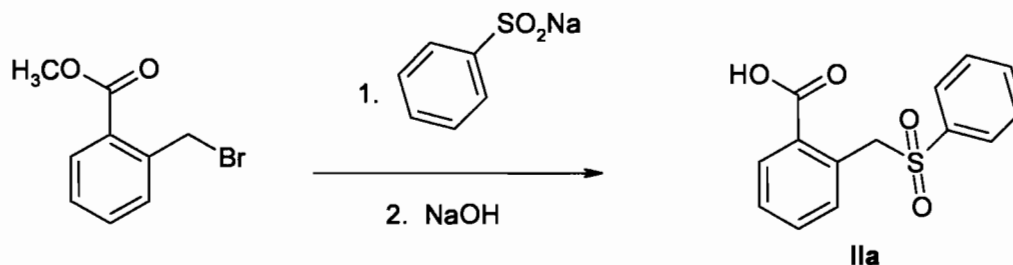


Prepararea acidului 2-(feniltiometil)-benzoic (**IIIa**) și a acidului 2-(p-toliltiometil)-benzoic (**IIIb**) este prezentată în următoarele articole:

1. Stecoza C.E. și col., *Rev. Chim. (București)*, **2011**, 62(6), 610-613
2. Sadek B, și col., *Sci.Pharm.*, **2011**, 79( 4), 749-761

- b. oxidarea compușilor **IIIa** și **IIIb** obținuți în etapa a, cu o soluție de peroxid de hidrogen 30%, în raport molar 1:10, în mediu de acid acetic glacial

Se cunoaște un procedeu de preparare a compușilor **II**, descris în literatură [Patra A. și col., *Synthesis*, **2006**, 15, 2556-2562], care constă în reacția bromometilbenzoatului de metil cu bezensulfinatul de sodiu în DMF la temperatura camerei, urmată de hidroliza esterului rezultat cu o soluție apoasă de hidroxid de sodiu:



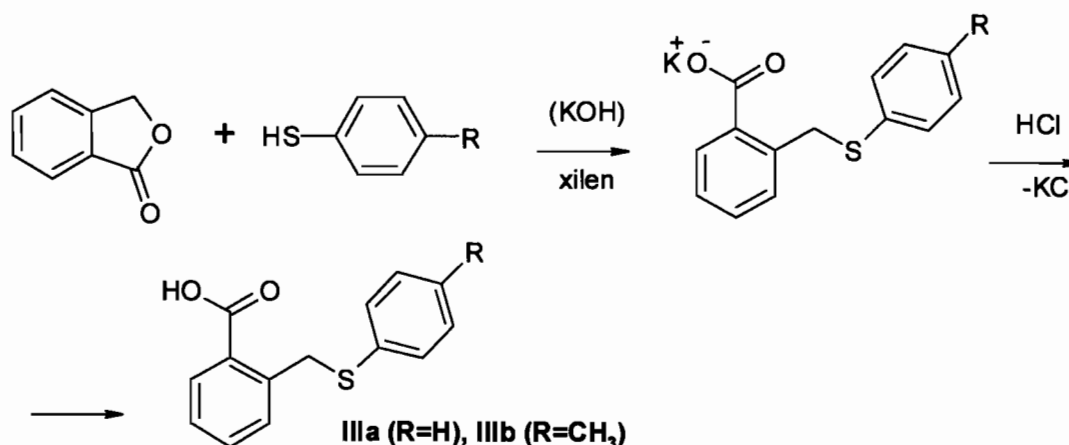
Avantajele de preparare a acizilor **IIa** și **IIb** prin noul procedeu, conform invenției sunt: randamentele mai mari de obținere, utilizarea unor reactanți mai puțin toxici, mai prietenoși cu mediul (ex. peroxidul de hidrogen).

Într-un alt aspect, invenția se referă la o compoziție farmaceutică, care conține, ca unic principiu activ antitumoral, un derivat de 2-aryl(heteroaryl)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol cu formula generală **I**, definit mai sus, împreună cu excipienții acceptabili farmaceutic.

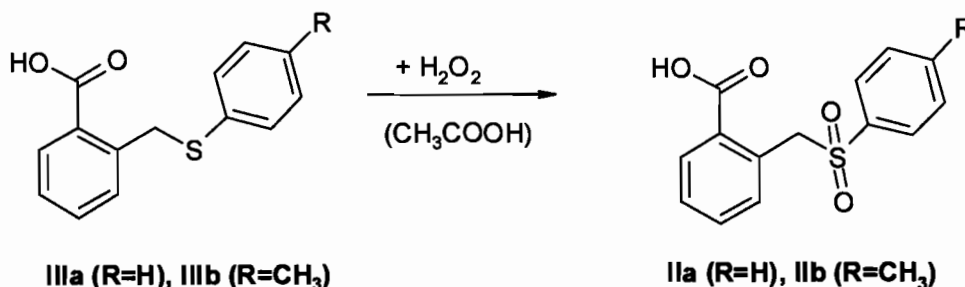
Într-un alt aspect, invenția se referă la utilizarea unui derivat de 2-aryl(heteroaryl)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol cu formula generală **I**, definit mai sus, pentru prepararea unui medicament destinat tratamentului antitumoral.

Procedeu de preparare a derivaților de 2-aryl(heteroaryl)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol **I** definiți ca mai sus, conform invenției, cuprinde următoarele etape:

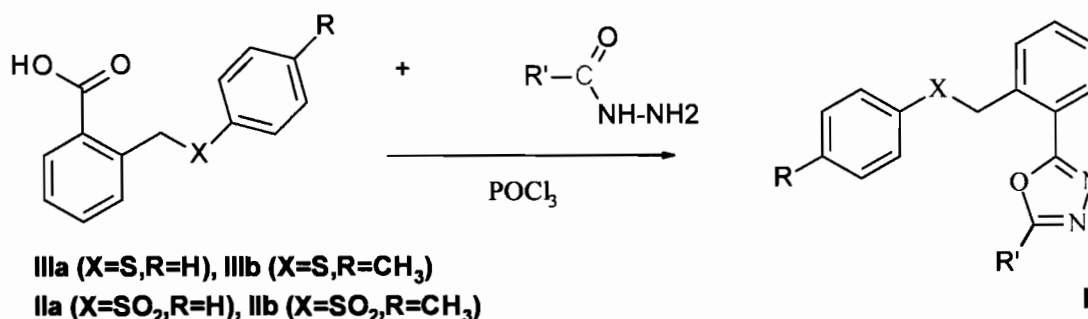
- a. Sinteza acidului 2-(feniltiometil)-benzoic (**IIIa**) și a acidului 2-(p-toliltiometil)-benzoic (**IIIb**) prin reacția ftalidei cu tiofenolul respectiv cu p-tiocrezolul. Intermediar se formează sărurile de potasiu ale acestor acizi, care sunt solubile în apă și pot fi separate de stratul organic prin tratare cu o soluție diluată de acid clorhidric



- b. Sinteza acidului 2-[(fenilsulfonil)metil]-benzoic (**IIa**) și a acidului 2-[(4-metilfenil)sulfonilmetil]-benzoic (**IIb**) prin oxidarea acizilor **IIIa** și **IIIb** obținuți în etapa a, cu o soluție de peroxid de hidrogen 30%, în raport molar 1:10, în mediu de acid acetic glacial, conform noului procedeu al invenției



- c. Sinteza noilor derivați de 2-aril(heteroaril)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol **I** prin refluxarea acidului 2-(feniltiometil)-benzoic (**IIIa**), a acidului 2-(p-toliltiometil)-benzoic (**IIIb**), a acidului 2-[(fenilsulfonil)metil]-benzoic (**IIa**) sau a acidului 2-[(4-metilfenil)sulfonilmetil]-benzoic (**IIb**) cu diverse hidrazide ale unor acizi aromatici (heteroaromatici), în prezența oxiclururii de fosfor



R, X și R' au semnificația prezentată anterior la formula generală a noilor compuși.

Procedeu de obținere a unor 1,3,4-oxadiazoli-2,5-disubstituiți printr-o reacție de ciclodeshidratare pornind de la diverse hidrazide și diverși acizi aromatici, în prezența oxiclururii de fosfor este prezentat în literatură: Dofe V. S și col., *Res. Chem. Intermed.*, **2017**, 43(12), 7331-7345; Kumar H. și col., *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, 43(12), 2688-2698.

Avantajul derivaților de 2-aril(heteroaril)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol (**I**) conform invenției constă în faptul că aceștia exercită o acțiune citotoxică crescută, asupra liniilor celulare umane de adenocarcinom mamar și adenocarcinom de colon, comparabilă sau superioară unor medicamente antitumorale de referință.

Avantajul de preparare a acizilor **IIa** și **IIb** prin noul procedeu, conform invenției sunt: randamentele mai mari de obținere, utilizarea unor reactanți mai puțin toxici, mai prietenoși cu mediul (ex. peroxidul de hidrogen).

Pentru dovedirea structurii noilor compuși s-a efectuat analiza spectrală și elementală. Spectrele  $^1\text{H}$ -RMN și  $^{13}\text{C}$ -RMN au fost înregistrate la 300 MHz, respectiv 75,075 MHz, folosind un aparat Varian Gemini 300BB, utilizând ca solvent cloroformul deuterat ( $\text{CDCl}_3$ ), iar ca standard intern tetrametilsilanul (TMS). Pentru atribuirea univocă a semnalelor s-au efectuat și experimente bi-dimensionale COSY și HETCOR.

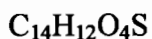
Analiza elementală s-a realizat cu un aparat Perkin Elmer CHNS/O Analyser Series II 2400. Temperaturile de topire au fost determinate cu un aparat Electrothermal 9100 și sunt necorectate.

Rezultatele obținute prin analiza spectrală și elementală confirmă structura noilor compuși conform invenției.

Se dau în cele ce urmează 7 exemple de realizare a invenției:

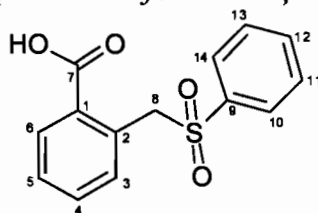
### Exemplul 1

*Sinteza acidului 2-[(fenilsulfonil)metil]-benzoic (IIa)*, compus intermediar obținut conform noului procedeu al invenției.



Într-un balon cu fund rotund, prevăzut cu refrigerent ascendent se solubilizează prin încălzire acidul 2-(feniltiometil)-benzoic (0,02 moli;  $M_r = 244,30$ ) în 100 mL acid acetic glacial. Se adaugă treptat și sub agitare continuă 20 mL (0,2 moli;  $M_r = 34,01$ ;  $d = 1,11$ ) soluție de peroxid de hidrogen 30%, apoi amestecul de reacție se refluxează timp de 2 ore. Se răcește, se diluează cu apă și se extrage de mai multe ori cu cloroform. Soluțiile cloroformice reunite se anhidriază pe sulfat de sodiu, iar după îndepărtarea cloroformului prin distilare la presiune scăzută, produsul brut obținut se purifică prin recristalizare din alcool etilic. Se obțin 5,16 g compus ( $M_r = 276,31$ ) (randament 93,5%), cristalin, alb cu P.t. = 154,3-155,3°C.

### *Dovedirea structurii compusului conform invenției*



Analiza RMN:

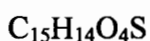
$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, J, Hz): 8.86 (sl, 1H, H-7); 8.05 (dd, 1H, H-6, 1.4, 7.5); 7.64 (dd, 2H, H-10, H-14, 1.4, 7.5); 7.59 (tt, 1H, H-12, 1.4, 7.2); 7.55 (td, 1H, H-4, 1.4, 7.5); 7.49 (m, 1H, H-5); 7.46 (m, 2H, H-11, H-13); 7.35 (dd, 1H, H-3, 1.4, 7.5); 5.10 (s, 2H, H-8)

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 171.88 (C-7); 137.90 (C-9); 129.97 (C-2); 129.45 (C-1); 129.04 (C-3); 128.98 (C-11, C-13); 128.62(C-10, C-14); 133.88(C-4 sau C-5); 133.74 (C-12); 133.02 (C-5 sau C-4); 131.86 (C-6); 59.46 (C-8)

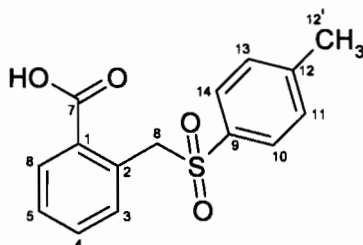
Analiza elementală: Teoretic C 60,86%, H 4,38%, S 11,60%. Experimental C 60,94%, H 4,28%, S 11,69%.

### Exemplul 2

Sinteza acidului 2-[(4-metilfenil)sulfonilmetil]-benzoic (**IIb**), compus intermediar obținut conform noului procedeu al invenției.



Într-un balon cu fund rotund, prevăzut cu refrigerent ascendent se solubilizează prin încălzire acidul 2-(p-toliltiometil)-benzoic (0,02 moli;  $M_r=258,34$ ) în 100 mL acid acetic glacial. Se adaugă treptat și sub agitare continuă 20 mL (0,2 moli;  $M_r=34,01$ ;  $d=1,11$ ) soluție de peroxid de hidrogen 30%, apoi amestecul de reacție se refluxează timp de 2 ore. Se răcește, se diluează cu apă și se extrage de mai multe ori cu cloroform. Soluțiile cloroformice reunite se anhidrizează pe sulfat de sodiu, iar după îndepărtarea cloroformului prin distilare la presiune scăzută, produsul brut obținut se purifică prin recristalizare din alcool etilic. Rezultă 5,46 g compus ( $M_r=290,34$ ) (randament 94%), cristalin, alb cu P.t. = 192,3-193,1°C.



Analiza RMN:

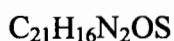
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 8.03 (dd, 1H, H-6, 1.6, 7.7); 7.54 (td, 1H, H-4, 7.7, 1.6); 7.52 (d, 2H, H-10, H-14, 8.2); 7.47 (td, 1H, H-5, 7.7, 1.6); 7.34 (dd, 1H, H-3, 1.6, 7.7); 7.26 (d, 2H, H-11, H-13, 8.2); 5.07 (s, 2H, H-8); 2.39 (s, 3H, H-12')

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 171.40 (C-7); 144.89 (C-12); 135.03 (C-9); 133.69 (C-4 sau C-5); 132.92 (C-5 sau C-4); 131.75 (C-6); 129.96 (C-2); 129.96 (C-1); 129.58 (C-11, C-13); 128.96 (C-3); 128.64 (C-10, C-14); 59.61(C-8); 21.61 (C-12')

Analiza elementală: Teoretic C 62,05%, H 4,86%, S 11,04%. Experimental C 62,14%, H 4,80%, S 11,12%.

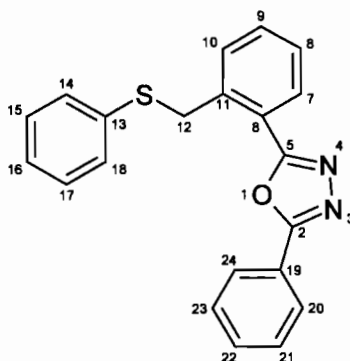
### Exemplul 3

Sinteza 2-fenil-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazolului (**Ia**)





Într-un balon cu fund rotund prevăzut cu refrigerent ascendent se dizolvă acidul 2-(feniltiometil)-benzoic (0,01 moli;  $M_r=244,3$ ) și benzoilhidrazina (0,01 moli;  $M_r=136,15$ ) în 45 mL oxiclорură de fosfor și se refluxează timp de 9 ore. După răcire, amestecul de reacție se toarnă în gheață, apoi se lasă în repaus timp de 24 de ore. Precipitatul format se izolează prin filtrare la presiune scăzută, spălându-se pe hârtia de filtru până când apele de spălare au pH neutru. Produsul brut astfel rezultat se purifică prin recristalizare din alcool etilic. Rezultă 2,37 g compus ( $M_r=344,44$ ) (randament 69%), cristalin, alb cu cu P.t. 111,5-112°C.



#### Analiza RMN:

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 8,03 (dd, 7,7, 1,6, 2H, H-20, H-24); 7,95 (ddd, 1H, H-7); 7,42-7,49 m (3H, H-21, H-22, H-23); 7,27-7,35 m (3H; H-8, H-9, H-10); 7,22 td (2H, H-14, H-18); 7,07-7,15 m (3H, H-15, H-16, H-17); 4,64 (s, 2H, H-12)

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 164,39 (C-2(5)); 164,26 (C-5(2)); 138,07 (Cq); 135,60 (Cq); 131,90 (CH); 131,61 (2CH); 131,44 (CH); 131,39 (CH); 129,51 (CH); 129,23 (2CH); 128,90 (2CH); 127,75 (CH); 127,13 (2CH); 127,02 (CH); 123,97 (CH); 122,84 (CH); 38,30 (C-12)

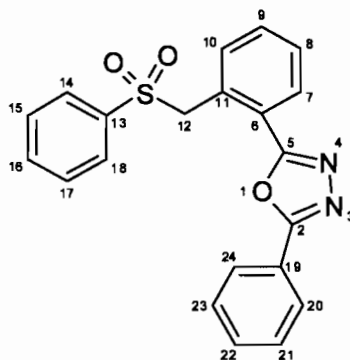
Analiza elementală: Teoretic C 73,23%, H 4,68%, N 8,13%, S 9,31%. Experimental C 73,31%, H 4,60%, N 8,20%, S 9,24%.

#### Exemplul 4

##### Sinteza 2-fenil-5-[2-(fenilsulfonilmetil)fenil]-1,3,4-oxadiazolului (**Ib**)

$\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$

Într-un balon cu fund rotund prevăzut cu refrigerent ascendent se dizolvă acidul 2-[(fenilsulfonil)metil]-benzoic (0,01 moli;  $M_r=276,31$ ) și benzoilhidrazina (0,01 moli;  $M_r=136,15$ ) în 45 mL oxiclорură de fosfor și se refluxează timp de 9 ore. După răcire, amestecul de reacție se toarnă în gheață, apoi se lasă în repaus timp de 24 de ore. Precipitatul format se izolează prin filtrare la presiune scăzută, spălându-se pe hârtia de filtru până când apele de spălare au pH neutru. Produsul brut astfel rezultat se purifică prin recristalizare din alcool etilic. Rezultă 2,23 g compus ( $M_r=376,44$ ) (randament 59,2%), cristalin, alb cu cu P.t. 194,8-196,1°C.

**Analiza RMN:**

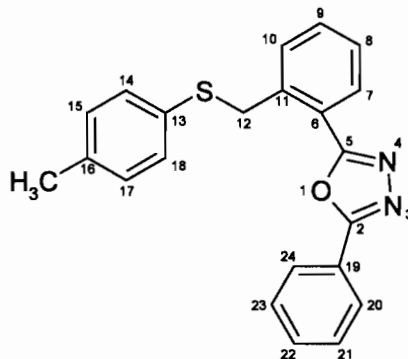
$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm  $J$  Hz): 7,97 (dd, 8.0, 2.4, 2H, H-14, H-18); 7,77 (dd, 7.1, 1.8, 1H, H-7); 7,00-7,60 (m, 11H, H-arom); 5,26 (s, 2H, H-12)

$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 164,05 (C-2(5)); 163,46 (C-5(2)); 138,07 (Cq); 134,03 (CH); 133,48 (CH); 132,09 (CH); 131,60 (CH); 129,46 (CH); 129,27 (2CH); 129,09 (CH); 128,87 (CH); 128,72 (2CH); 128,69 (CH); 127,99 (Cq); 127,02 (2CH); 124,37 (Cq); 123,53 (Cq); 59,38 (C-12)

Analiza elementală: Teoretic C 67,01%, H 4,28%, N 7,44%, S 8,52%. Experimental C 67,09%, H 4,19%, N 7,38%, S 8,60%.

**Exemplul 5****Sinteza 2-fenil-5-[2-(p-tolil-tiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazolului (Ic)**

Într-un balon cu fund rotund prevăzut cu refrigerent ascendent se dizolvă acidul 2-(p-toliltiometil)-benzoic (0,01 moli;  $M_r=258,34$ ) și benzoilhidrazina (0,01 moli;  $M_r=136,15$ ) în 45 mL oxiclurură de fosfor și se refluxează timp de 9 ore. După răcire, amestecul de reacție se toarnă în gheață, apoi se lasă în repaus timp de 24 de ore. Precipitatul format se izolează prin filtrare la presiune scăzută, spălându-se pe hârtia de filtru până când apele de spălare au pH neutru. Produsul brut astfel rezultat se purifică prin recristalizare din alcool etilic. Rezultă 2,43 compus ( $M_r=358,47$ ) (randament 68%), cristalin, alb cu cu P.t. 115,6-116,81°C.

**Analiza RMN:**

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm  $J$  Hz): 8,11 (dd, 7,4, 1,5, 2H, H-20, H-24); 8,01 (dd, 7,0, 2,2, 1H, H-7); 7,48-7,58 (m, 3H, H-8, H-9, H-10); 7,40 (t, 6,5, 2H, H-21, H-23); 7,31 (t, 6,5, 1H, H-22); 7,17 (d, 8,1, 2H, H-15, H-17); 6,98 (d, 8,1, 2H, H-14, H-18); 4,66 (s, 2H, H-12); 2,22 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ )

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 164,21 (C-2(5)); 164,16 (C-5(2)); 138,32 (Cq); 137,20 (Cq); 137,19 (Cq); 132,38 (CH); 132,28 (CH); 131,73 (CH); 131,34 (CH); 131,21 (CH); 129,51 (2CH); 129,32 (CH); 129,07 (2CH); 127,49 (CH); 126,96 (2CH); 123,83 (Cq); 122,64 (Cq); 38,70 (C-12); 21,01 ( $\text{CH}_3$ )

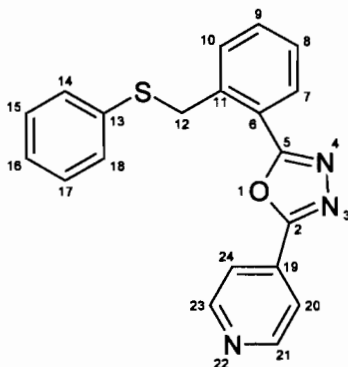
Analiza elementală: Teoretic C 73,72%, H 5,06%, N 7,81%, S 8,94%. Experimental C 73,81%, H 4,98%, N 7,72%, S 9,01%.

### Exemplul 6

Sinteza 2-(4-piridil)-5-[2-(feniltiometil) fenil]-1,3,4-oxadiazolului (**Id**)

$\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{OS}$

Într-un balon cu fund rotund prevăzut cu refrigerent ascendent se dizolvă acidul 2-(feniltiometil)-benzoic (0,01 moli;  $M_r=244,3$ ) și hidrazida acidului izonicotinic (0,01 moli;  $M_r=137,14$ ) în 45 mL oxiclură de fosfor și se refluxează timp de 9 ore. După răcire, amestecul de reacție se toarnă în gheață, apoi se lasă în repaus timp de 24 de ore. Precipitatul format se izolează prin filtrare la presiune scăzută, spălându-se pe hârtia de filtru până când apele de spălare au pH neutru. Produsul brut astfel rezultat se purifică prin recristalizare din alcool izopropilic. Rezultă 2,42g compus ( $M_r=345,43$ ) (randament 70%), cristalin, alb cu cu P.t. 130,4- 131,8°C.



Analiza RMN:

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{DMSO}+\text{CDCl}_3$  3:1,  $\delta$  ppm  $J$  Hz): 8,84 (d, 5,8, 2H, H-21, H-23); 8,07 (td, 4,0, 2,0, 1H, H-7); 8,03 (d, 5,8, 2H, H-20, H-24); 7,39-7,49 (m, 3H, H-8, H-9, H-10); 7,13-7,26 (m, 5H, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18); 4,71 (s, 2H, H-12)

<sup>13</sup>C-RMN (DMSO+CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 164, 50 (C-2(5)); 161,87 (C-5(2)); 149,90 (C-21, C-23); 137,56 (Cq); 135, 07 (Cq); 131,63 (CH); 131,14 (CH); 131,03 (CH); 129, 97 (2CH); 129,50 (CH); 128,64 (2CH); 127,73 (CH); 126,37 (CH); 121,70 (CH); 120, 41 (2CH); 36,54 (C-12)  
Analiza elementală: Teoretic C 69,54%, H 4,38%, N 12,16%, S 9,28%. Experimental C 69,48%, H 4,46%, N 12,26%, S 9,19%.

### Exemplul 7

#### *Evaluarea potențialului antitumoral al derivaților 1,3,4-oxadiazolici I*

Acțiunea antitumorală s-a realizat pe material biologic reprezentat de linii celulare standardizate, obținute din bănci internaționale de celule ("European Collection of Authenticated Cell Cultures" - ECACC), derivate din adenocarcinom uman de colon (linia celulară HT-29) și adenocarcinom uman de sân (liniile celulare MDA-MB 231 și MCF-7).

Citotoxicitatea derivaților 2-aril(heteroaril)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazolici I s-a realizat prin metoda colorimetrică MTS, comparativ cu cisplatinul (Cis-Pt) pentru linia celulară HT-29 și comparativ cu doxorubicina (DOX) pentru liniile celulare MDA-MB 231 și MCF-7.

Linia celulară HT-29 a fost izolată din tumora primară a unei paciente de 44 de ani de rasă caucaziană cu adenocarcinom de colon. Este o linie aderentă și prezintă morfologie de tip epitelial. Gena TP53 prezintă o mutație punctiformă G→A în codonul 273.

Linia celulară MCF-7 este o linie de adenocarcinom mamar izolată din lichidul pleural al unei paciente de rasă caucaziană de 69 de ani cu carcinom invaziv ductal mamar. Este o linie aderentă și prezintă morfologie de tip epitelial. Linia a reținut câteva caracteristici ale epiteliului mamar diferențiat. Nu prezintă mutații în TP53 (w/t).

Linia celulară MDA-MB-231 este o linie de adenocarcinom mamar izolată din lichidul pleural al unei paciente de rasă caucaziană de 51 de ani cu carcinom invaziv ductal mamar. Este o linie aderentă și prezintă morfologie de tip epitelial. Prezintă mutații în TP53.

#### *Principiul metodei*

Celulele au fost menținute în plăci de cultură în mediu DMEM / F12 suplimentat cu 2 mM L-glutamină, 10% ser fetal de vițel, 100 UI / mL penicilină, 100 μg / mL streptomicină și incubate în condiții standard de 37°C și atmosferă umedă cu 5% CO<sub>2</sub>. După 24 h celulele aderente au fost tratate cu diferite concentrații ale compușilor pentru 24 h. Tratamentele cu Cis-Pt și cei patru derivați s-au realizat folosind concentrații de 200 μM; 100 μM; 50 μM; 25 μM; 12,5 μM și 6,25 μM, iar tratamentul cu doxorubicină s-a efectuat cu concentrații de 20 μM; 10 μM; 5 μM; 2,5 μM; 1,25 μM și 0,625 μM. S-au pregătit soluțiile stoc în DMSO și

au fost păstrate la  $-20^{\circ}\text{C}$ . Concentrații de lucru ale compușilor au fost preparate în stocurile din mediu de cultură înainte de fiecare experiment.

Citotoxicitatea compușilor utilizați în experimente a fost testată cu ajutorul kitului CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega). Această metodă este rapidă și eficientă și poate fi utilizată pentru determinarea numărului de celule viabile aflate în proces de proliferare, în analiza efectului citotoxic indus de agenți terapeutici, precum și la determinarea procesului de adeziune celulară sau de chemotaxie.

Metoda se bazează pe capacitatea celulelor active metabolic de a reduce sarea galbenă de tetrazoliu la formazan colorat, solubil în mediu de cultură a celulelor. Kitul conține compusul tetrazolic MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolium și reactivul PES (etosulfat de fenazină), cu ajutorul căruia MTS formează o soluție stabilă. Cantitatea de formazan produsă este măsurată prin citirea absorbției la lungimea de undă  $\lambda = 490 \text{ nm}$  și este direct proporțională cu numărul celulelor viabile din cultură.

Rezultatele obținute la evaluarea efectului citotoxic al derivaților 1,3,4-oxadiazolici I prin tehnica colorimetrică MTS, sunt prezentate în tabelele 1-3.

Procentul de viabilitate comparativ cu celulele netratate (considerate viabile 100%) a fost calculat după formula: Viabilitatea celulară (%) = (absorbția celulelor tratate - absorbția mediului de cultură) / (absorbția celulelor netratate - absorbția mediului de cultură)  $\times 100$ .

Cele trei linii tumorale folosite pentru experimente au fost tratate, pentru 24 h, în triplicat, cu cei patru compuși sintetizați și cu cei doi agenți oncolitici utilizați în chimioterapie (Cis-Pt și DOX). Viabilitatea celulelor a fost exprimată ca valoare medie  $\pm$  abaterea standard (SD) a experimentelor.

Tabelul 1

Rezultatele viabilității celulare la 24 de ore în testarea pe linia celulară HT-29

Substanță	Viabilitate (%)					
	200 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	12,5 $\mu\text{M}$	6,25 $\mu\text{M}$
01BH	62,22 $\pm$ 2,52	63,44 $\pm$ 1,09	66,18 $\pm$ 0,61	68,01 $\pm$ 0,03	69,07 $\pm$ 0,94	71,76 $\pm$ 0,48
01BHO2	54,62 $\pm$ 2,78	57,56 $\pm$ 2,67	61,49 $\pm$ 3,02	62,42 $\pm$ 0,80	64,02 $\pm$ 0,61	67,21 $\pm$ 1,18
02BH	61,63 $\pm$ 0,66	64,95 $\pm$ 1,49	68,09 $\pm$ 0,96	69,10 $\pm$ 2,84	69,58 $\pm$ 0,35	70,94 $\pm$ 0,48
01HIN	61,16 $\pm$ 1,69	62,54 $\pm$ 4,24	64,28 $\pm$ 1,92	66,17 $\pm$ 0,09	68,30 $\pm$ 0,38	69,36 $\pm$ 0,34
Cis-Pt	57,66 $\pm$ 1,20	67,47 $\pm$ 1,23	73,34 $\pm$ 0,37	84,09 $\pm$ 0,46	88,73 $\pm$ 0,55	91,52 $\pm$ 1,42

Tabelul 2

Rezultatele viabilității celulare la 24 de ore în testarea pe linia celulară MDA-MB 231

Substanță	Viabilitate (%)					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
01BH	42,16±1,72	45,42±0,47	46,71±0,97	48,03±0,94	52,26±0,45	53,64±1,20
01BHO2	34,97±0,55	39,66±1,58	40,84±0,79	43,41±0,30	50,07±0,88	52,27±1,03
02BH	36,54±1,12	45,61±0,79	53,07±0,54	55,98±0,99	56,09±0,90	57,31±1,23
01HIN	15,90±0,52	21,70±1,03	23,82±1,12	32,70±0,47	39,91±0,64	44,16±0,45
DOX	56,93±0,04	64,29±2,08	66,70±1,15	77,60±0,44	81,78±0,67	84,43±0,67

Pentru compușii 01BH, 01BHO2, 02BH și 01HIN s-au folosit diluții seriale de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, începând de la concentrația de 200  $\mu$ M, iar pentru DOX s-au folosit diluții seriale de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, începând de la concentrația de 20  $\mu$ M.

Tabelul 3

Rezultatele viabilității celulare la 24 de ore în testarea pe linia celulară MCF-7

Substanță	Viabilitate (%)					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
01BH	43,19±2,69	51,60±1,77	52,60±1,61	53,48±1,15	56,26±1,57	58,88±0,30
01BHO2	46,90±0,35	54,35±0,56	55,99±0,67	57,32±0,66	58,80±0,28	59,18±0,48
02BH	55,89±1,54	57,31±1,77	60,46±0,38	61,55±2,40	62,75±1,44	67,69±0,07
01HIN	46,14±2,22	53,32±2,43	55,28±0,82	57,89±1,66	58,77±0,99	59,15±0,60
DOX	57,52±1,77	58,07±1,01	59,78±0,62	61,14±0,53	62,60±0,25	64,10±0,14

Pentru compușii 01BH, 01BHO2, 02BH și 01HIN s-au folosit diluții seriale de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, începând de la concentrația de 200  $\mu$ M, iar pentru DOX s-au folosit diluții seriale de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, începând de la concentrația de 20  $\mu$ M,

În urma tratamentului cu derivații 1,3,4-oxadiazolici I și cu cele două citostatice (Cis-Pt și DOX), pe cele trei linii luate în studiu, se observă că efectul antitumoral este dependent de doză, scăderea viabilității celulare fiind direct proporțională cu creșterea concentrației compușilor. Inhibarea proliferării celulare s-a făcut în funcție de tipul de tratament și de concentrațiile utilizate.

Procentul de viabilitate în cazul tratamentelor pe linia celulară de adenocarcinom de colon HT-29 este mai mic, comparativ cu cisplatin, la concentrațiile folosite între 6,25 $\mu$ M și 100 $\mu$ M, ceea ce conduce la concluzia că acești compuși sunt mai activi decât citostaticul. Expunerea acestei linii celulare la derivatul 01BHO2 în concentrație 50 $\mu$ M, timp de 24h, a

condus la o scădere importantă a viabilității (61,49%), comparativ cu cisplatinul (73,34%) (tabelul 1).

Linia tumorală MDA-MB 231 este cea mai sensibilă la tratamentul cu compuși sintetizați, obținându-se valori scăzute ale viabilității pentru toți cei patru derivați. De exemplu, în cazul expunerii acestei linii celulare la derivatul 01BH în concentrație 50 $\mu$ M, timp de 24h, procentul de viabilitate celulară este mai redus (46,71%), comparativ cu procentul de viabilitate în cazul celorlalte două linii celulare: 66,18% pentru linia celulară HT-29 și 52,60% pentru linia celulară MCF-7 (tabelele 1-3).

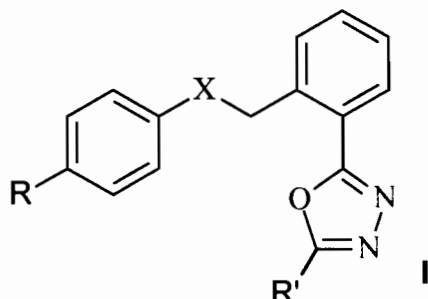
În urma evaluării potențialului antitumoral pe linia celulară de adenocarcinom mamar MDA-MB 231, se observă în cazul derivatului 01HIN o scădere semnificativă a viabilității la toate concentrațiile utilizate, acesta fiind cel mai activ dintre cei patru derivați. Prin expunerea acestei linii celulare la derivatul 01HIN în concentrație 50  $\mu$ M, timp de 24h, procentul de viabilitate celulară este de 23,82%. Viabilitatea se reduce la 21,70%, odată cu creșterea concentrației la 100  $\mu$ M. (tabelul 2). Se remarcă astfel că introducerea unui nucleu piridinic pe structura 1,3,4-oxadiazolică a determinat o scădere accentuată a procesului de proliferare în cazul celulelor de adenocarcinom mamar MDA-MB 231.

Și în cazul tratamentelor pe linia celulară de adenocarcinom mamar MCF-7, procentul de viabilitate este redus și scade odată cu creșterea concentrației, în cazul expunerii acestei linii celulare la derivatul 01BH în concentrație 50 $\mu$ M, timp de 24h, procentul de viabilitate fiind de 52,60% (tabelul 3).

În determinările efectuate pe liniile tumorale MDA-MB 231 și MCF-7 doxorubicina a fost folosită ca și control pozitiv, aceasta fiind unul dintre cei mai activi agenți anticanceroși.

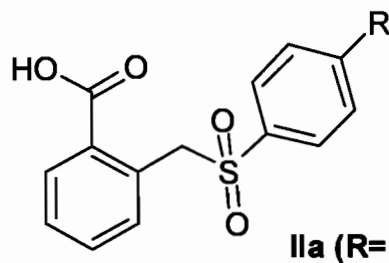
## REVENDICĂRI

1. Derivați de 2-aryl(heteroaril)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol cu formula generală I:



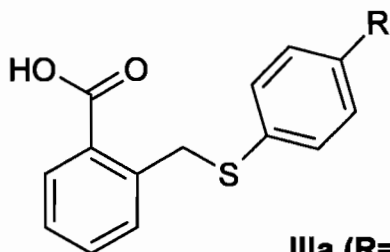
**caracterizați prin aceea că** R este -H sau o grupă -CH<sub>3</sub>, X este S sau SO<sub>2</sub> și R' este aril nesubstituit, mono- sau polisubstituit cu radicali alchil C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, halogen, -NO<sub>2</sub>, heteroaril cu 5-6 membri cu N, S, O

2. Procedeu de preparare a acidului 2-[(fenilsulfonil)metil]-benzoic (**IIa**) și a acidului 2-[(4-metilfenil)sulfonilmetil]-benzoic (**IIb**), **caracterizat prin aceea că** are loc în următoarele etape:



**IIa (R=H), IIb (R=CH<sub>3</sub>)**

a. reacția ftalidei cu tiofenolul, respectiv cu p-tiocrezolul, cu obținerea compușilor **IIIa** și **IIIb**



**IIIa (R=H), IIIb (R=CH<sub>3</sub>)**

b. oxidarea compușilor **IIIa** și **IIIb** obținuți în etapa a, cu o soluție de peroxid de hidrogen 30%, în raport molar 1:10, în mediu de acid acetic glacial



3. Compoziție farmaceutică, **caracterizată prin aceea că** aceasta conține, ca unic principiu activ antitumoral, un derivat de 2-aryl(heteroaryl)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol cu formula generală I, definit în revendicarea 1, împreună cu excipienți acceptabili farmaceutic.

4. Utilizarea unui derivat de 2-aryl(heteroaryl)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol cu formula generală I, definit în revendicarea 1, pentru prepararea unui medicament destinat tratamentului antitumoral.