



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

- (21) Nr. cerere: **a 2020 00446**
(22) Data de depozit: **27/07/2020**
(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/03/2022** BOPI nr. **3/2022**

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

(73) Titular:
• **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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
CN 103848826 A; CN 104327063 A;
CN 110372627 A; EP 1472246 B1

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



RO 134538 B1

1 Invenția se referă la derivați de 2-aril(heteroaril)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadia-
zol, la procedeu de preparare a acestora și la o compoziție farmaceutică ce conține derivații
3 de 2-aril(heteroaril)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol pentru utilizare ca agenți anti-
tumoral.

5 Cancerul este o maladie datorată procesului de multiplicare dezordonată a unei
celule care a scăpat de sub controlul mecanismelor de autoreglare ale organismului,
7 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
9 acestuia a crescut semnificativ în decursul timpului. Deși în ultimii ani s-au înregistrat pro-
grese care au dus la schimbări majore în tratamentul diferitelor forme de cancer, principalele
11 obstacole în succesul terapiei au rămas dezvoltarea rezistenței celulelor tumorale la diverșii
agenți chimioterapici precum și imposibilitatea de eradicare a tuturor celulelor tumorale.

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

17 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
19 obținerea de molecule originale, capabile să trateze cancerul și care să vizeze mecanisme
moleculare cum ar fi semnalizarea celulară, apoptoza, transcripția genelor, angiogeneza etc.

21 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.**
23 **și col., Eur. J. Med. Chem, 2015, 97, 124-141; Khanam R. și col., J. Pharm. Anal.**
2019,9(2), 133-141].

25 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.,**
27 **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
29 timidin-fosforilazei. Introducerea nucleului piridinic pe structura oxadiazolică a determinat
intensificarea acțiunii inhibitorii.

31 Au fost sintetizați și testați o serie de derivați 1,3,4-oxadiazolici, care conțin un frag-
ment benziltio legat de nucleul oxadiazolic. Compușii s-au dovedit activi ca agenți antitumo-
33 rali prin diverse mecanisme moleculare: inhibarea telomerasei [**Xiao-Min Z. și col., Bioorg.**
Med. Chem., 2011, 19, 6518-6524], inhibarea kinazei de adeziune focală (FAK) [**Shuai Z.**
35 **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].**

37 Alte studii realizate pe derivați 1,3,4-oxadiazolici 2-fenil-5-heteroaril-substituiți au
descries efectul acestora asupra liniei celulare de cancer de sân MCF-7, evidențiind că
39 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.**
41 **Intermed., 2017, 43(12), 7331-7345].**

43 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].**

45 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 antiretro-
47 viral utilizat în tratamentul infecției HIV, oxolamina, medicament antitusiv, furamizolul,
medicament antibacterian.

RO 134538 B1

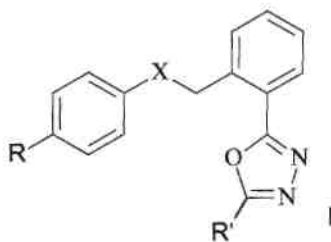
În literatură sunt descriși 1,3,4-oxadiazoli-2,5-disubstituiți obținuți printr-o reacție de ciclodeshidratare pornind de la diverse hidrazide și diverși acizi aromatici, în prezența oxiclururii de fosfor: **Dofe V. S și col., Res. Chem. Intermed., 2017, 43(12), 7331-7345;** **Kumar H. și col., Eur. J.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

Întrucât la nivel global, cancerul este una dintre cauzele majore de morbiditate și mortalitate, OMS avertizând că în următorii 20 de ani cazurile de cancer s-ar putea dubla, cancerul pulmonar, de sân și colorectal fiind cele mai frecvente tipuri de cancer, se manifestă necesitatea de a descoperi noi compuși antitumorali cu proprietăți îmbunătățite.

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 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-aryl(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-aryl(heteroaril)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol cu următoarea formulă generală **I**:



în care

R este -H sau o grupare -CH₃

X este S sau SO₂ și

R' este arii nesubstituit, mono- sau polisubstituit cu radicali alchil C₁-C₃, halogen, -NO₂, heteroaril cu 5-6 membri cu N, S, O.

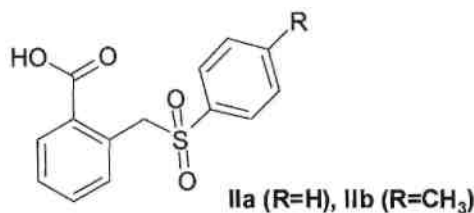
Într-un aspect preferat în mod deosebit, invenția se referă la un derivat de 2-aryl(heteroaril)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol selectat din grupul care constă din: 2-fenil-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol

2-fenil-5-[2-(fenilsulfonilmetil)fenil]-1,3,4-oxadiazol

2-fenil-5-[2-(p-tolil-tiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol

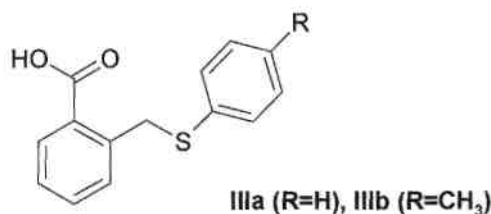
2-(4-piridil-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol.

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-(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 **IIa** și **IIb**

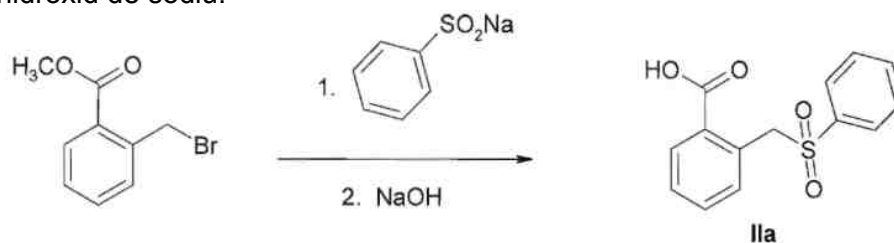


9 Prepararea acidului 2-(feniltiometil)-benzoic (**IIIa**) și a acidului 2-(p-toliltiometil)-benzoic (**IIIb**) este prezentată în următoarele articole:

11 1. **Stecoza CE. și col., Rev. Chim. (București), 2011, 62(6), 610-613.**

11 2. **Sadek B, și col., Sci.Pharm., 2011, 79(4), 749-761.**

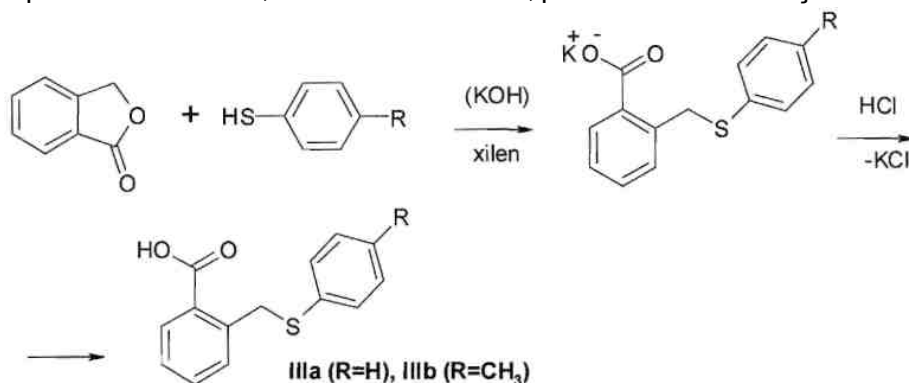
13 b. oxidarea compușilor **IIIa** și **IIIb** obținuți în etapa a, cu o soluție de peroxid de
15 hidrogen 30%, în raport molar 1:10, în mediu de acid acetic glacial Se cunoaște un procedeu
17 de preparare a compușilor **II**, descris în literatură [**Patra A. și col., Synthesis, 2006, 15, 2556-2562**], 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:



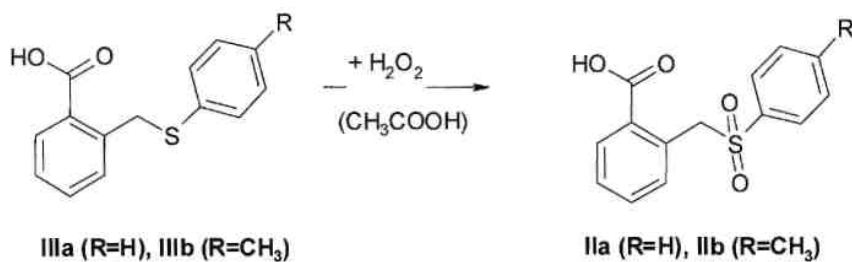
25 Avantajele de preparare a acizilor **IIa** și **IIb** prin noul procedeu, conform invenției sunt:
27 randamentele mai mari de obținere, utilizarea unor reactanți mai puțin toxici, mai prietenoși
29 cu mediul (exemplu: peroxidul de hidrogen).

Într-un alt aspect invenția se referă la un procedeu de obținere a unui derivat de 2-
31 aril(heteroaril)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol, cu formula generală **I** definit mai sus,
33 conform invenției, care are loc în următoarele etape:

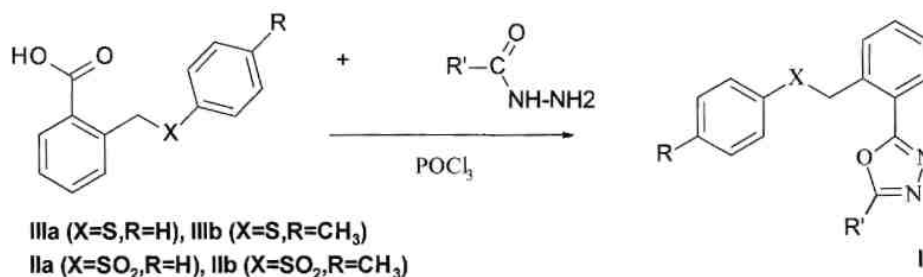
a. sinteza acidului 2-(feniltiometil)-benzoic (**IIIa**) și a acidului 2-(p-toliltiometil)-benzoic
35 (**IIIb**) prin reacția ftalidei cu tiofenolul respectiv cu p-tiocrezolul; separarea de stratul organic
37 a sărurilor de potasiu ale acizilor, formate intermediar, prin tratare cu o soluție diluată de acid
39 clorhidric.



45 b. Sinteza acidului 2-[(fenilsulfonil)metil]-benzoic (**IIa**) și a acidului 2-[(4-
47 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 oxiclorurii de fosfor



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

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

Într-un alt aspect, invenția se referă la derivați de 2-aril(heteroaril)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol cu formula generală I, definiți mai sus, pentru utilizare ca agenți antitumorali.

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.

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 (exemplu: peroxidul de hidrogen).

Pentru dovedirea structurii noilor compuși s-a efectuat analiza spectrală și elementală. Spectrele ¹H-RMN și ¹³C-RMN au fost înregistrate la 300 MHz, respectiv 75,075 MHz, folosind un aparat Varian Gemini 300BB, utilizând ca solvent cloroformul deuterat (CDCl₃), 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.

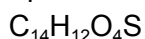
Rezultatele obținute prin analiza spectrală și elementală confirmă structura noilor compuși conform invenției.

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

RO 134538 B1

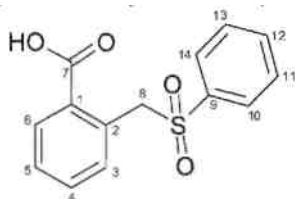
1 Exemplul 1

3 Sinteza acidului 2-[(fenilsulfonil)metil]-benzoic (**Ila**), compus intermediar obținut
conform procedurii invenției.



5 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.
7 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 h. Se răcește,
9 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
11 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.

13 Dovedirea structurii compusului conform invenției



19 Analiza RMN:

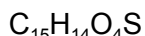
21 1H -NMR ($CDCl_3$, δ ppm, J , Hz): 8,86 (sl, 1H, H-7); 8,05 (dd, 1H, H-6, 1,4, 7,5); 7,64
(dd, 2H, H-10, H-14, 1,4, 7,5); 7,59 (tt, 1H, H-12, 1,4, 7,2); 7,55 (td, 1H, H-4, 1,4, 7,5); 7,49
(m, 1H, H-5); 7,46 (m, 2H, H-11, H-13); 7,35 (dd, 1H, H-3, 1,4, 7,5); 5,10 (s, 2H, H-8)

23 ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, δ 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);
25 133,02 (C-5 sau C-4); 131,86 (C-6); 59,46 (C-8)

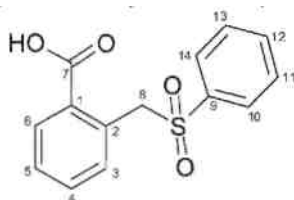
27 Analiza elementală: Teoretic C 60,86%, H 4,38%, S 11,60%. Experimental C 60,94%,
H 4,28%, S 11,69%.

29 Exemplul 2

31 Sinteza acidului 2-[(4-metilfenil)sulfonilmetil]-benzoic (**Iib**), compus intermediar obținut
conform procedurii invenției.



33 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; $M_r = 34,01$; $d = 1,11$)
35 soluție de peroxid de hidrogen 30%, apoi amestecul de reacție se refluxează timp de 2 h. Se
răcește, se diluează cu apă și se extrage de mai multe ori cu cloroform. Soluțiile cloroformice
37 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.
39 Rezultă 5,46 g compus ($M_r = 290,34$) (randament 94%), cristalin, alb cu P.t. = 192,3-193,1°C.



45 Analiza RMN:

47 1H -NMR ($CDCl_3$, δ 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')

RO 134538 B1

^{13}C -NMR (CDCl_3 , δ 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')

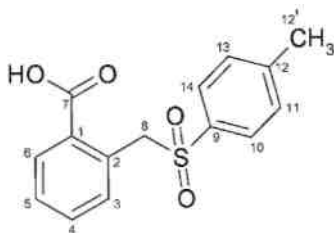
Analiza elementală: Teoretic C 62,05%, H 4,86%, S 11,04%. Experimental C 62,14%, H 4,80%, S 11,12%.

Exemplul 3

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

$\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{OS}$

Într-un balon cu fund rotund prevăzut cu refrigerent ascendent se dizolvă acidul 2-(feniltiometil)-benzoic (0,01 moli; $M_r = 244,3$) și benzoilhidrazina (0,01 moli; $M_r = 136,15$) în 45 mL oxiclorură de fosfor și se refluxează timp de 9 h. După răcire, amestecul de reacție se toarnă în gheață, apoi se lasă în repaus timp de 24 h. 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 P.t. 111,5-112°C.



Analiza RMN:

^1H -RMN (CDCl_3 , δ 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)

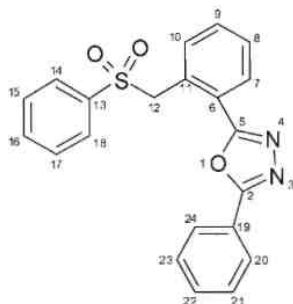
^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ ppm): 164,39 (C-2(5)); 164,26 (C-5(2)); 138,07 (Cq); 135,60 (Cq); 131,90 (CH); 131,61 (2CH); 131,44 (CH); 131,39 (CH); 129,51 (CH); 129,23 (2CH); 128,90 (2CH); 127,75 (CH); 127,13 (2CH); 127,02 (CH); 123,97 (CH); 122,84 (CH); 38,30 (C-12)
Analiza elementală: Teoretic C 73,23%, 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 oxiclorură de fosfor și se refluxează timp de 9 h. După răcire, amestecul de reacție se toarnă în gheață, apoi se lasă în repaus timp de 24 h. 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 P.t. 194,8-196,1°C.



RO 134538 B1

1 Analiza RMN:

¹H-RMN (CDCb, δ 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)

¹³C-RMN (CDCl₃, δ 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)

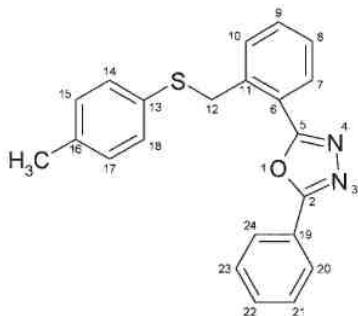
Analiza elementală: Teoretic C 67,01%, H 4,28%, N 7,44%, S 8,52%, Experimental C 67,09%, H 4,19%, N 7,38%, S 8,60%.

Exemplul 5

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

C₂₂H₁₈N₂OS

13 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 15 45 mL oxiclură de fosfor și se refluxează timp de 9 h. După răcire, amestecul de reacție se toarnă în gheață, apoi se lasă în repaus timp de 24 h. Precipitatul format se izolează prin 17 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 19 2,43 compus (M_r = 358,47) (randament 68%), cristalin, alb cu cu P.t. 115,6-116,81°C.



21

23

25

27

Analiza RMN:

29 ¹H-RMN (CDCl₃, 8 ppm δ 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, CH₃)

33 ¹³C-RMN (CDCl₃, δ 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 (CH₃)

37 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%.

39 Exemplul 6

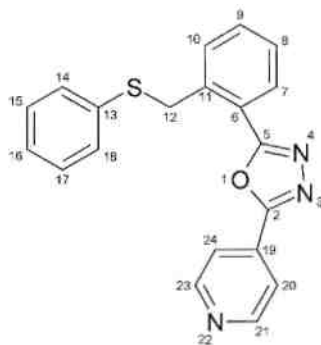
Sinteza 2-(4-piridil)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazolului (Id)

41 C₂₀H₁₅N₃OS

43 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 h. După răcire, amestecul de reacție se toarnă în gheață, apoi se lasă în repaus timp de 24 h. Precipitatul format se izolează prin filtrare la presiune scăzută, spălându-se pe hârtia de filtru până când apele de 45 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. 47 130,4-131,8°C.

49

RO 134538 B1



Analiza RMN:

^1H -RMN (DMSO + CDCl_3 3:1, δ 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)

^{13}C -RMN (DMSO+ CDCl_3 , 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-aryl(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 \rightarrow 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomicină și incubate în condiții standard de 37°C și atmosferă umedă cu 5% CO_2 . 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°C. Concentrații de lucru ale compușilor au fost preparate în stocurile din mediu de cultură înainte de fiecare experiment.

RO 134538 B1

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

6 Metoda se bazează pe capacitatea celulelor active metabolic de a reduce sarea
7 galbenă de tetrazoliu la formazan colorat, solubil în mediu de cultură a celulelor. Kitul conține
8 compusul tetrazolic MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfofenil)-
9 2H-tetrazolium și reactivul PES (etosulfat de fenazină), cu ajutorul căruia MTS formează o
10 soluție stabilă. Cantitatea de formazan produsă este măsurată prin citirea absorbantei la
11 lungimea de undă $\lambda = 490$ nm și este direct proporțională cu numărul celulelor viabile din
12 cultură.

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

15 Procentul de viabilitate comparativ cu celulele netratate (considerate viabile 100%)
16 a fost calculat după formula: Viabilitatea celulară (%) = (absorbanta celulelor tratate -
17 absorbanta mediului de cultură)/(absorbanta celulelor netratate - absorbanta mediului de
18 cultură) x 100.

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

23 Rezultatele viabilității celulare la 24 h în testarea pe linia celulară HT-29

24 Tabelul 1

	Viabilitate (%)					
Substanță	200 μ M	100 μ M	50 μ M	25 μ M	12,5 μ M	6,25 μ M
27 Ia	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
29 Ib	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
31 Ic	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
Id	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
33 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

35 Rezultatele viabilității celulare la 24 h în testarea pe linia celulară MDA-MB 231

36 Tabelul 2

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

RO 134538 B1

Pentru compușii Ia, Ib, Ic și Id s-au folosit diluții seriale de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, începând de la concentrația de 200 μM, 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 μM.

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

Tabelul 3

Substanță	Viabilitate (%)					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Ia	43,19±2,69	51,60±1,77	52,60±1,61	53,48±1,15	56,26±1,57	58,88±0,30
Ib	46,90±0,35	54,35±0,56	55,99±0,67	57,32±0,66	58,80±0,28	59,18±0,48
Ic	55,89±1,54	57,31±1,77	60,46±0,38	61,55±2,40	62,75±1,44	67,69±0,07
Id	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 Ia, Ib, Ic și Id s-au folosit diluții seriale de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, începând de la concentrația de 200 μM, 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 μM.

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 μM și 100 μM, ceea ce conduce la concluzia că acești compuși sunt mai activi decât citostaticul. Expunerea acestei linii celulare Ia derivatul Ib în concentrație 50 μM, timp de 24 h, 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 compușii sintetizați, obținându-se valori scăzute ale viabilității pentru toți cei patru derivați. De exemplu, în cazul expunerii acestei linii celulare la derivatul Ia în concentrație 50 μM, timp de 24 h, 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).

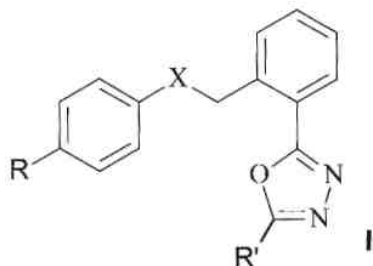
În urma evaluării potențialului antitumoral pe linia celulară de adenocarcinom mamar MDA-MB 231, se observă în cazul derivatului Id o scădere semnificativă a viabilității la toate concentrațiile utilizate, acesta fiind cel mai activ dintre cei patru derivați. Prin expunerea acestei linii celulare la derivatul Id în concentrație 50 μM, timp de 24 h, procentul de viabilitate celulară este de 23,82%. Viabilitatea se reduce la 21,70%, odată cu creșterea concentrației la 100 μM. (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 Ia derivatul Ia în concentrație 50 μM, timp de 24 h, 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-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol cu formula generală (I):



în care, R este -H sau o grupare -CH₃, X este S sau SO₂ și R' este arii nesubstituit, mono- sau polisubstituit cu radicali alchil C₁-C₃, halogen, -NO₂, heteroaril cu 5-6 membri cu N, S, O.

2. Derivați de 2-aril(heteroaril)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol, conform revendicării 1, **caracterizați prin aceea că**, sunt selectați dintre:

2-fenil-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol

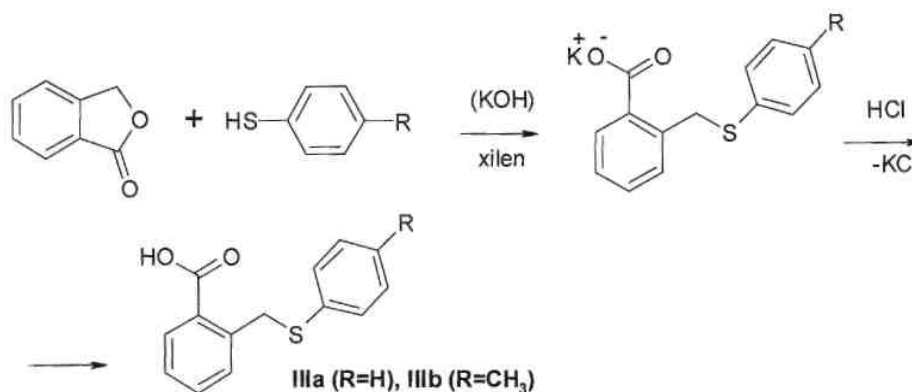
2-fenil-5-[2-(fenilsulfonilmetil)fenil]-1,3,4-oxadiazol

2-fenil-5-[2-(p-tolil-tiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol

2-(4-piridil-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol.

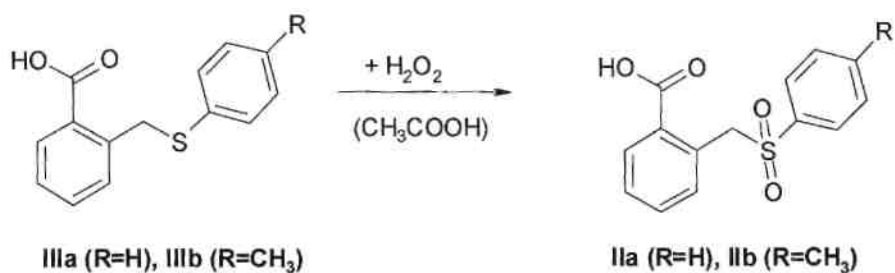
3. Procedeu de preparare a derivaților de 2-aril(heteroaril)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol cu formula generală (I), definiți în revendicarea 1, care cuprinde etapele de:

a) sinteză a acidului 2-(feniltiometil)-benzoic (**IIIa**) și a acidului 2-(p-toliltiometil)-benzoic (**IIIb**) prin reacția ftalidei cu tiofenolul respectiv cu p-tiocrezolul; separarea de stratul organic a sărurilor de potasiu ale acizilor, formate intermediar, prin tratare cu o soluție diluată de acid clorhidric

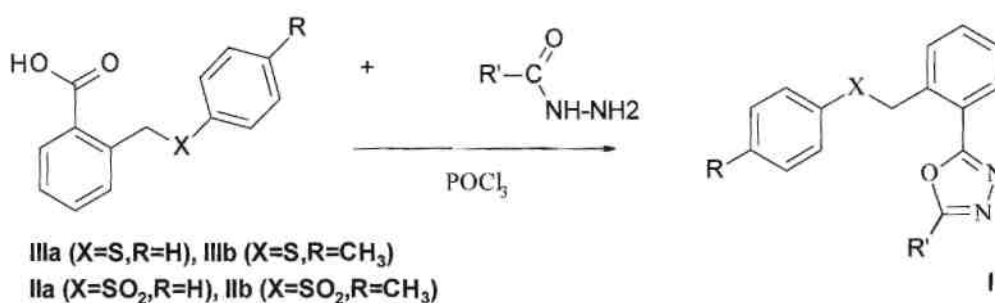


b) sinteză a acidului 2-[(fenilsulfonil)metil]-benzoic (**IIa**) și a acidului 2-[(4-metilfenil)sulfonilmetil]-benzoic (**IIb**) și

c) sinteză a derivaților de 2-aril(heteroaril)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol (I), **caracterizat prin aceea că**, etapa b) de sinteză a acidului 2-[(fenilsulfonil)metil]-benzoic (**IIa**) și a acidului 2-[(4-metilfenil)sulfonilmetil]-benzoic (**IIb**) are loc 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,



și caracterizat prin aceea că, etapa c) de sinteză a derivaților de 2-aryl(heteroaril)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol (I) are loc 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 hidrazide ale unor acizi aromatici (heteroaromatici), în prezența oxiclururii de fosfor



R, X și R' au semnificațiile definite în revendicarea 1.

4. Compoziție farmaceutică ce cuprinde un derivat de 2-aryl(heteroaril)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol cu formula generală (I), definit în revendicarea 1, împreună cu excipienți acceptabili farmaceutic.

5. Derivat de 2-aryl(heteroaril)-5-[2-(feniltiometil)fenil]-1,3,4-oxadiazol cu formula generală (I), definit în revendicarea 1, pentru utilizare ca agent antitumoral.

