



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00490

(22) Data de depozit: 03/08/2020

(41) Data publicării cererii:
26/02/2021 BOPI nr. 2/2021

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

(72) Inventatori:
• ROȘCA ELENA-VALENTINA,
STR. NICOLAE BĂLGESCU, BL. 3B, ET. 1,
AP. 6, RÂMNICU SĂRAT, BZ, RO;
• BĂRBUCEANU ȘTEFANIA-FELICIA,
STR. AGRICULTORI, NR. 44, BL. 1, ET. 4,
AP. 14, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• APOSTOL THEODORA - VENERA,
STR. ANTON PANN, NR. 24, ET. 1, AP. 6,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• MANDA GINA, STR. DR. EUGEN O. IOSIF
NR. 9, AP. 1, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;
• DRĂGHICI CONSTANTIN,
BD. TIMIȘOARA NR. 49, BL. CC6, SC. A,
ET. 2, AP. 7, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• FĂRCĂȘANU ILEANA CORNELIA,
STR. POLONĂ, NR. 23A, AP. 4, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;

• NEAGOE IONELA VICTORIA,
BD. MIHAIL KOGĂLNICEANU NR. 35,
SC. A, AP. 47, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;
• SURCEL MIHAELA,
ALEEA BARAJUL ROVINARI, NR. 12,
BL. Y12, SC. A, AP. 3, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• RUȚĂ LAVINIA LILIANA,
STR. CAP. ION GHEORGHE, NR. 2, BL. 81,
SC. 1, AP. 10, ET. 4, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• NIȚULESCU GEORGE MIHAI,
ȘOS. OLTENIȚEI NR. 40-44, BL. 6A, SC. 4,
ET. 7, AP. 145, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO;
• BĂRBUCEANU FLORICA,
STR. SOLDAT STELIAN MIHALE, NR. 7,
BL. PM95, AP. 7, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• ISCRULESCU LUCIAN,
STR. LIVIU REBREANU, NR. 7, BL. 51, SC. 1,
ET. 7, AP. 32, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• DINU PÂRVU CRISTINA ELENA,
STR. GH. LAZĂR NR. 10, ET. 1, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) DERIVAȚI DE 4-(4-(DIALCHILAMINO)BENZILIDEN) OXAZOL-
5(4H)-ONĂ FLUORESCENȚI, NECITOTOXICI CU APLICAȚII
BIOMEDICALE CARE CONȚIN UN RADICAL
ARILSULFONILFENIL ÎN POZIȚIA 2

(57) Rezumat:

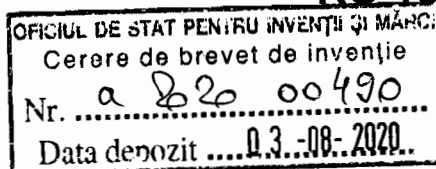
Invenția se referă la compuși din clasa oxazol-5(4H)-onelor utilizați ca agenți fluorescenți non-citotoxici pentru detectarea și vizualizarea celulelor tumorale umane, cu scop diagnostic sau de monitorizare a terapiei. Compușii, conform invenției, sunt derivați de 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă care conțin un frag-

ment arilsulfonilfenil în poziția 2, cu formula generală I, în care R este metil sau etil și X este H, Cl sau Br.

Revendicări: 2
Figuri: 7

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).





**DERIVAȚI DE 4-(4-(DIALCHILAMINO)BENZILIDEN)OXAZOL-5(4H)-ONĂ
FLUORESCENȚI, NECITOTOXICI CU APLICAȚII BIOMEDICALE CARE CONȚIN UN
RADICAL ARILSULFONILFENIL ÎN POZIȚIA 2**

Prezenta invenție se referă la proiectarea, obținerea, evaluarea proprietăților fluorescente și a citotoxicității a 6 noi derivați de 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă care conțin un radical arilsulfonilfenil în poziția 2.

Acești compuși au fost sintetizați și caracterizați din punct de vedere fizico-chimic și biologic cu scopul utilizării lor ca marcatori fluorescenți non-toxici pentru celule tumorale umane.

Invenția se înscrie în cadrul preocupărilor la nivel mondial pentru descoperirea unor noi agenți fluorescenți care să permită detectarea și vizualizarea celulelor tumorale, cu scop diagnostic sau de monitorizare a terapiei.

Compușii din clasa oxazol-5(4H)-onelor sunt intens studiați atât pentru proprietățile lor farmacologice (anticanceroase, antimicrobiene, analgezice, antiinflamatoare, etc.) [Sharma, N., și colab., „A review on oxazolone, it's method of synthesis and biological activity”, Eur. J. Biomed. Pharm. Sci., 2015, 2(3), 964-987][Coffen, D.L. și colab., „Oxazolone derivatives and uses thereof”, US 6355641, 2002][Savariz, F.C. și colab., „Synthesis and Evaluation of New β -carboline-3-(4-benzylidene)-4H-oxazol-5-one Derivatives as Antitumor Agents”. Molecules, 2012, 17, 6100-6113], dar și chimice, fiind utilizați în sinteza unor noi heterocicluri, peptide, etc. [Mohamed, L.W. și colab., „Design & synthesis of novel oxazolone & triazinone derivatives and their biological evaluation as COX-2 inhibitors”, Bioorg. Chem., 2017, 72, 308-314][Abdel-Motaleb, R.M. și colab., „A Simple and Convenient Synthesis of 4-Ylidene-5(4H)oxazolone Derivatives: Oxazolone Ring Transformation Leading to Other Heterocyclic Structures”, J. Het. Chem., 2012, 49, 1071-1076][Benoiton, N.L. și colab., „Amino-acid conjugates of the hapten 2-phenyl-4-ethoxymethylene-5(4H)-oxazolone. Synthesis and confirmation of structure”, Int. J. Peptide Protein Res. 45, 1995, 266-271][Mita, R. și colab., „Process for producing N-acylphenylalanines”, US 4612388, 1986].

Mai mult, nucleul oxazolic este prezent în structura unor compuși folosiți ca substanțe active în compoziția unor medicamente, printre care: oxaprozinul cu acțiune antiinflamatoare, mubritinibul cu acțiune antineoplazică, sulfamoxolul cu acțiune antibacteriană, aleglitazarul utilizat ca antidiabetic, etc. [Kakkar, S., Narasimhan, B., „A comprehensive review on biological activities of

oxazole derivatives”, BMC Chem, 2019, 13(16), 1-24][Rossa, T.A. și colab., „Continuous multistep synthesis of 2-(azidomethyl)oxazoles”, Beilstein J. Org. Chem., 2018, 14, 506-514].

În ultimii ani, unii compuși din clasa oxazol-5(4*H*)-onelor au captat atenția cercetătorilor datorită prezenței pe nucleul heterociclic a unor grupe funcționale în pozițiile 2 și 4, care conferă proprietăți de fluorescență, cu aplicații în bioimagistică [Bósze, S. și colab., „Synthesis and Spectroscopic Properties of 4-Ethoxymethylene-2-(1)-naphthyl-5(4*H*)-oxazolone Labeled Fluorescent Peptides”, Biopolymers, 2006, 81, 81-91][Rodrigues, C.A.B. și colab., „Two-photon absorption properties of push-pull oxazolones derivatives”, Dyes Pigm., 2012, 95, 713-722].

Numeroși derivați din clasa 4-ariliden-oxazol-5(4*H*)-onelor prezintă proprietăți fluorescente [Rodrigues, C.A.B. și colab., „Unsaturated oxazolones as nonlinear fluorophores”, Dyes Pigm. 2013, 99, 642-652][Fozooni, S. și colab., „A synthesis of some new 4-arylidene-5(4*H*)-oxazolone azo dyes and an evaluation of their solvatochromic behaviour”, ARKIVOC, 2008, xiv, 115-123].

Mai mult, pornind de la modelul structural al cromoforului GFP (*green fluorescent proteins*), proteină naturală care emite o radiație de culoare verde la interacțiunea cu radiația ultravioletă sau cu lumina albastră din domeniul vizibil, s-au sintetizat analogi cu nucleu de oxazol-5(4*H*)-onă care pot fi utilizați ca marcatori fluorescenți în biologie [Deng, H. și colab., „Self-restricted oxazolone GFP chromophore for construction of reaction-based fluorescent probe toward dopamine”, Mater. Today Chem., 2017, 3, 73-81][Bourotte, M. și colab., „Fluorophores related to the green fluorescent protein”, Tetrahedron Lett., 2004, 45, 6343-6348].

În ceea ce privește stadiul actual al aplicațiilor acestor compuși oxazolonic fluorescenți, sunt menționate: utilizarea lor ca indicatori de pH, ca modulatori ai unor molecule care pot suferi modificări structurale în prezența luminii, sau ca indicatori fluorescenți în unele metode de dozare a unor ioni sau substanțe [Ertekin, K. și colab., „Photophysical and photochemical characteristics of an azlactone dye in sol-gel matrix; a new fluorescent pH indicator”, Dyes Pigm., 2003, 56(2), 125-133][Blanco-Lomas, M., și colab., „Benzylidene-Oxazolones as Molecular Photoswitches”, Org. Lett., 2012, 14(17), 4334-4337][Funes-Ardoiz, I. și colab., „Benzylidene-oxazolones as photoswitches: photochemistry and theoretical calculations”, Tetrahedron, 2013, 69, 9766-9771][Ozturk, G. și colab., „Photophysical characterization of fluorescent oxazol-5-one derivatives in PVC and their application as biosensors in the detection of ACh and AChE inhibitor: donepezil”, Dyes Pigm., 2008, 76(3), 792-798].

Este cunoscut faptul că marcatorii celulari fluorescenți trebuie să prezinte stabilitate chimică, solubilitate, difuziune în țesuturi și biocompatibilitate. De asemenea, fotostabilitatea, intensitatea

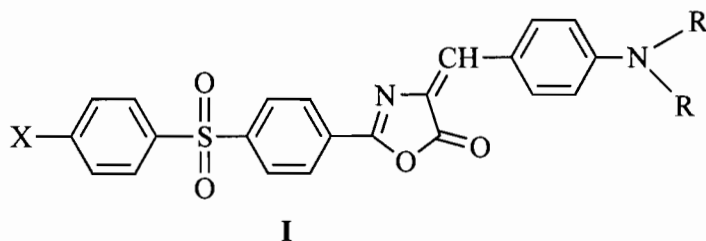
absorbției radiației, dar și a emisiei radiației ca urmare a excitației sunt proprietăți esențiale pentru o moleculă cu rol de marcator celular, o fluorescență stabilă fiind determinată de conjugarea electronică [Dean, K.M. și colab., „Advances in fluorescence labeling strategies for dynamic cellular imaging”, Nat. Chem. Biol., 2014, 10(7), 512-523][Krawczyk, P. și colab., „Synthesis, photophysical and biological properties of a new oxazolone fluorescent probe for bioimaging: an experimental and theoretical study”, Org. Biomol. Chem., 2017, 15, 8952-8966]. În plus, marcatorul fluorescent trebuie să se lege ușor de structura celulară vizată [Zhan, C. și colab., „A Fluorescent Probe for Early Detection of Melanoma and Its Metastasis by Specifically Imaging Tyrosinase Activity in a Mouse Model”, Anal. Chem., 2018, 90(15), 8807-8815]. Aceste caracteristici ale marcatorilor fluorescenți organici sunt extrem de importante pentru citometrie și pentru imagistica celulară de fluorescență *in vivo*.

În etapa de proiectare a noilor oxazolone nesaturate fluorescente, am luat în considerare grefarea pe nucleul oxazolonic a fragmentului arilsulfonilfenil, deoarece acesta reprezintă un farmacofor important în chimia farmaceutică, cunoscut fiind faptul că diferiți derivați din clasa sulfonelor prezintă un spectru larg de proprietăți biologice, printre care antitumorale, antibacteriene, antiinflamatoare, etc. [Ahmad, I. și Shagufta, „Sulfones: an important class of organic compounds with diverse biological activities”, Int. J. Pharm. Pharm. Sci., 2015, 7(3), 19-27]. Mai mult, datele din literatură indică proprietățile fluorescente ale unor compuși care conțin grupa sulfonică în moleculă [Ai, Q. și colab., „Turn-On Fluorescent Photochromic Disulfonylarylthiophenes: Effect of Sulfone Groups on Fluorescence and Conversion”, Bull. Korean Chem. Soc., 2018, doi: 10.1002/bkcs.11597].

Prin urmare, ținând cont de proprietățile biologice ale compușilor din clasa oxazol-5(4*H*)-onelor și ale diarilsulfonelor, precum și de faptul că grupele funcționale de tip dialchilamino intensifică proprietățile fluorescente ale acestor compuși prin conjugări electronice [You, Y. și colab., „Fluorophores Related to the Green Fluorescent Protein and Their Use in Optoelectronic Device”, Adv. Mater., 2000, 12(22), 1678-1681], ne-am propus să reunim, într-o singură moleculă originală, aceste fragmente farmacofore, cu scopul obținerii unor noi derivați cu proprietăți fluorescente superioare, pentru a fi utilizați în marcarea celulelor tumorale.

Invenția de față se referă la proiectarea și la obținerea unor noi derivați de 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4*H*)-onă, care conțin un substituent arilsulfonilfenil în poziția 2 și la evaluarea fluorescenței și citotoxicității, în vederea utilizării în bioimagistică a acestora.

Prezenta invenție face referire la derivați de 4-(4-(dialchilamino)benziliden)-2-(4-(4-X-fenilsulfonil)fenil)oxazol-5(4H)-onă cu structura chimică definită prin formula generală I:



în care R este metil sau etil și X este H, Cl sau Br.

Elementele de originalitate constau în:

- 1) sinteza și caracterizarea fizico-chimică a unor noi compuși cu citotoxicitate scăzută din clasa oxazol-5(4H)-onelor;
- 2) demonstrarea capacității compușilor de a marca fluorescent celulele de *Saccharomyces cerevisiae*, fără a le împiedica dezvoltarea;
- 3) demonstrarea capacității compușilor de a marca fluorescent celule umane normale (monocite aparținând liniei celulare umane CRL9855) sau celule tumorale (celule de cancer de colon din linia HCT116, celule de adenocarcinom colorectal uman din linia HT-29, celule de glioblastom din linia U-87MG).

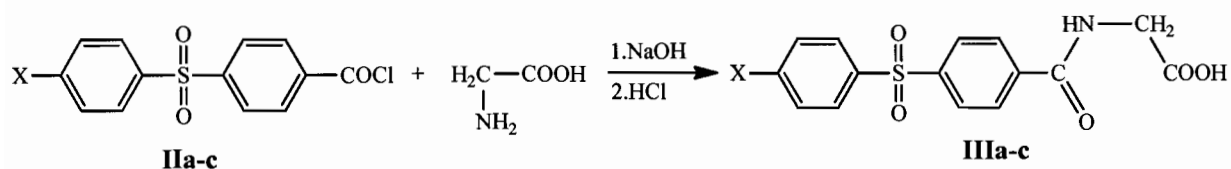
Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în obținerea unor compuși (printr-o metodă de sinteză care asigură un grad înalt de puritate și reproductibilitate sintetică în condiții de laborator) cu fluorescență pozitivă semnificativă la incubarea cu celule de *Saccharomyces cerevisiae* sau cu celule umane CRL9855, HT-29, HCT116 și U-87MG, având citotoxicitate scăzută asupra celulelor umane normale (monocite CRL9855) și tumorale (liniile HT-29 și HCT116).

Prezenta invenție cuprinde și o serie de corelații între fluorescența și citotoxicitatea *in vitro* a compușilor oxazolonic și structura chimică a acestora, prin studii de interacție cu celule non-umane (*S. cerevisiae*), dar și cu celule umane normale și canceroase standardizate.

Conform invenției, procedeul general de obținere a noilor derivați de 4-(4-dialchilamino)benzilidenoxazol-5(4H)-onă, care conțin un substituent arilsulfonilfenil greșat în poziția 2, definiți anterior, decurge prin următoarele etape:

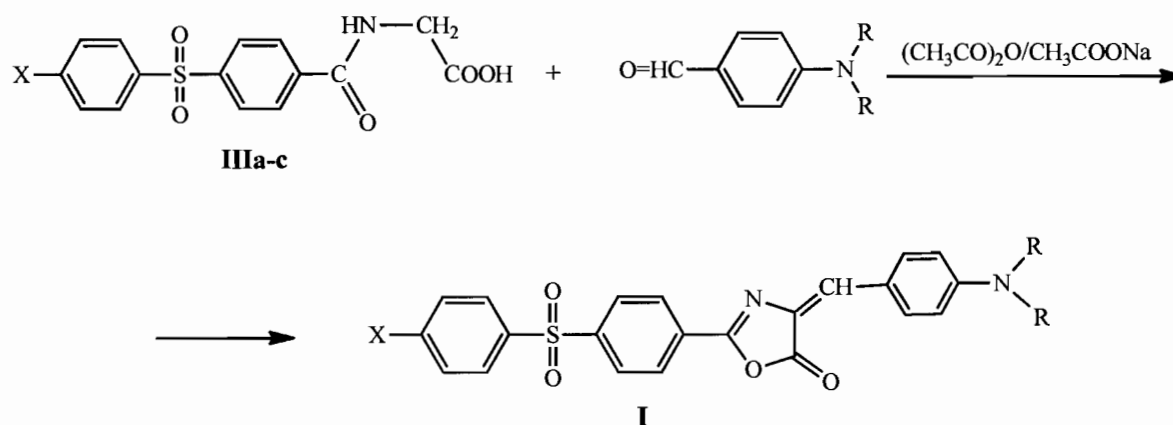
- a) prepararea acizilor 2-(4-(4-X-fenilsulfonil)benzamido)acetici, unde X=H, Cl sau Br, care au fost obținuți conform datelor din literatura de specialitate [Schiketanz, I. și colab., „Aminoketone,

oxazole and thiazole synthesis. Part 15.¹ 2-[4-(4-Halobenzenesulphonyl)-phenyl]-5-aryloxazoles”, ARKIVOC, (ii), 2002, 64-72] [Schiketanz, I. și colab., „Aminoketone, oxazole and thiazole synthesis. Part. 16. ¹ Novel 5-aryl-2-(*para*-benzenesulfonylphenyl)oxazoles”, Rev. Roum. Chim., 2002, 47(3-4), 235-238] (schema 1).



Schema 1

b) prepararea noilor 4-(4-(dialchilamino)benziliden)-2-(4-(4-X-fenilsulfonil)fenil)oxazol-5(4*H*)-one prin metoda Erlenmeyer care constă în condensarea și ciclizarea simultană a unui α -aminoacid N-acilat cu o aldehidă aromatică substituită [Rosca, E. și colab., „Synthesis, Characterization and Cytotoxicity Evaluation of New Compounds from oxazol-5(4*H*)-ones and 1,2,4-triazin-6(5*H*)-ones”, Rev. Chim. (Bucharest), 2019, 70(11), 3769-3774] [Rosca, E. și colab., „*In silico* and experimental studies for the development of novel oxazol-5(4*H*)-ones with pharmacological potential”, Farmacia, 2020, 68(3), 453-462]. Astfel, noile oxazolone au fost obținute prin reacția de ciclo-condensare a acizilor 2-(4-(4-X-fenilsulfonil)benzamido)acetici **IIIa-c** cu 4-(dialchilamino)-benzaldehyde, unde alchil, R, este metil sau etil, la reflux, timp de 4 ore, în mediu de anhidridă acetică și în prezență de acetat de sodiu anhidru (schema 2).



I.1a: X=H, R=CH₃; **I.1b:** X=Cl, R=CH₃; **I.1c:** X=Br, R=CH₃
I.2a: X=H, R=C₂H₅; **I.2b:** X=Cl, R=C₂H₅; **I.2c:** X=Br, R=C₂H₅

Schema 2

Acetatul de sodiu are rol de catalizator și a fost adăugat în amestecul de reacție în raport echimolar. S-a folosit un exces de anhidridă acetică de 20 de ori mai mare.

După refluxare, peste amestecul de reacție răcit la temperatura camerei, s-a adăugat alcool etilic rece. Suspensia astfel formată a fost lăsată la rece (2-8°C) peste noapte, apoi precipitatul a fost separat prin filtrare la vid, spălându-se alternativ cu etanol rece și cu apă fierbinte, după care a fost uscat la temperatura camerei.

Oxazol-5(4*H*)-onele obținute au fost purificate prin recristalizare dintr-un amestec etanol:cloroform în raport volumetric de 1:2, rezultând pulberi sau cristale de culoare roșie sau violet.

Dovedirea structurii chimice a noilor 4-(4-(dialchilamino)benziliden)-2-(4-(4-X-fenilsulfonil)fenil)oxazol-5(4*H*)-one

Toți reactanții și solvenții folosiți au fost achiziționați comercial cu puritate mare și au fost utilizați fără purificare ulterioară.

Temperaturile de topire ale noilor compuși au fost determinate cu un aparat Boetius și sunt necorectate.

Analiza elementală s-a realizat cu un aparat Perkin-Elmer 2400 Series II CHNS/O Elemental Analyzer (Waltham, MA, USA).

Spectrele de absorbție în infraroșu s-au înregistrat în pastilă de bromură de potasiu, cu un spectrometru Bruker Vertex 70, în intervalul 4000-400 cm^{-1} , intensitățile benzilor de absorbție fiind raportate în termeni semicantitativi notați astfel: fi - foarte intensă, i - intensă, m - medie, s - slabă.

Spectrele de rezonanță magnetică de proton $^1\text{H-RMN}$ au fost înregistrate în cloroform deuterat (CDCl_3) cu un spectrometru Varian Gemini 300BB, la 300 MHz. Deplasările chimice sunt redată în părți per milion (ppm), raportarea făcându-se la standardul intern tetrametilsilan (TMS), iar constantele de cuplare J sunt redată în herți (Hz). Multiplicitățile sunt abreviate astfel: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet); l (larg).

Spectrele de masă (MS) ale compușilor **I.2a-c** au fost înregistrate cu un spectrometru de masă triplu cuadropol 1200 L MS/MS de la Varian, echipat cu o sursă de ionizare electrospray (ESI). Substanța (1 mg) a fost dizolvată în 2 mL acid formic 85%. 10 μL din această soluție au fost diluați la 2 mL cu metanol, moment în care culoarea soluției a devenit roșie. Soluția din substanța de analizat a fost încărcată într-o buclă de 1 mL și infuzată în interfața ESI cu o pompă Prostar 240 SDM printr-o valvă de injecție manuală Rheodyne 7725. Debitul de infuzare a fost de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, gazul de uscure a avut presiunea de 21 psi și temperatura de 400°C, iar gazul de nebulizare a avut presiunea

de 42 psi. Ionul molecular protonat a fost selectat de cuadrupolul Q1 în condiții optimizate ale tensiunii pe capilar. Fragmentele au fost obținute prin coliziune cu argon (1,5 mTorr) în cuadrupolul Q2, și au fost scanate cu cuadrupolul Q3. Pentru compușii I.1a-c ionii moleculari au rezultat prin ionizare chimică la presiune atmosferică (APCI), urmându-se aceeași tehnică.

Spectrele de absorbție au fost înregistrate cu un spectrometru UV-Viz Jasco V-630, prin iradierea soluțiilor în dimetilsulfoxid (DMSO) ale noilor compuși la concentrația $\approx 2,5 \times 10^{-5}$ mol/L.

Descrierea pe scurt a desenelor:

- fig. 1 prezintă spectrele de fluorescență în domeniul 550-700 nm pentru compușii I.1a-c și I.2a-c;
- fig. 2 prezintă imagini obținute prin microscopie de fluorescență a celulelor de *S. cerevisiae* marcate cu DAPI și compusul I.1c;
- fig. 3 prezintă încorporarea compușilor I.1a-c și I.2a-c în monocite umane din linia CRL9855, evaluată prin citometrie în flux (excitare la 488 nm și emisie în canalul de fluorescență FL2-oranj);
- fig. 4 prezintă fluorescența celulelor tumorale umane din linia HCT116 (carcinom colorectal) și U-87MG (glioblastom) incubate 24 de ore cu compușii I.1a-c și I.2a-c la concentrația de 20 μ M evaluată prin citometrie în flux (excitare la 488 nm și emisie în canalul de fluorescență FL2-oranj), rezultatele fiind prezentate ca procent de celule fluorescente (a) și ca intensitate medie de fluorescență (b);
- fig. 5 prezintă analiza comparativă a fluorescenței celulelor tumorale umane din liniile HT-29 (adenocarcinom colorectal), HCT116 (carcinom colorectal) și U-87MG (glioblastom), incubate 24h cu compușii I.2b și I.2c la concentrația de 20 μ M prin citometrie în flux (excitare la 488 nm și emisie în canalul de fluorescență FL2-oranj), rezultatele fiind prezentate ca procent de celule fluorescente (a) și ca intensitate medie de fluorescență (b);
- fig. 6 prezintă efectul exercitat de compușii I.2b și I.2c la concentrația de 20 μ M asupra reducerii MTS (a) și a eliberării LDH (b) de către celulele netumorale proliferative din linia CRL9855 (linie monocitară). Rezultatele sunt exprimate ca densitate optică (DO) și sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de probă;
- fig. 7 prezintă curbele doză-efect a compușilor I.2b și I.2c asupra celulelor tumorale de carcinom colorectal din liniile HT-29 (a) și HCT 116 (b), privind efectul exercitat asupra reducerii MTS. Rezultatele sunt exprimate ca densitate optică (DO) și sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de probă.

Se redă în cele ce urmează modul de obținere a celor 6 noi compuși oxazolonici fluorescenți.

Exemplul 1. Sinteza 2-(4-(fenilsulfonil)fenil)-4-(4-(dimetilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onei (I.1a)

Formula moleculară: C₂₄H₂₀N₂O₄S

Într-un balon prevăzut cu un refrigerent ascendent și cu un tub de clorură de calciu, se adaugă 3,19 g (10 mmoli) acid 2-(4-(fenilsulfonil)benzamido)acetic (Mr=319,33), 1,49 g (10 mmoli) 4-(dimetilamino)benzaldehida (Mr=149,19), 0,82 g (10 mmoli) acetat de sodiu (Mr=82,03) și 18,9 mL (20,42 g; 200 mmoli) anhidridă acetică (Mr=102,09; d₄²⁰= 1,082).

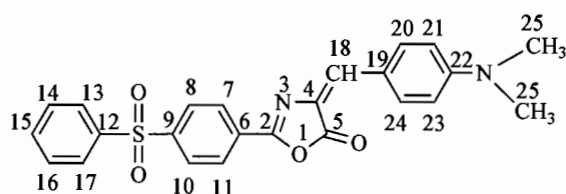
Inițial se formează o soluție care trece după câteva minute într-un precipitat consistent de culoare violet. Amestecul de reacție se refluxează timp de 4 ore. După răcire se adaugă alcool etilic rece, apoi amestecul se lasă la rece timp de 12 ore, după care se filtrează. Precipitatul rezultat se spală alternativ cu apă fierbinte și alcool etilic rece. Produsul obținut se purifică prin recristalizare dintr-un amestec de cloroform : alcool etilic = 2:1, v:v.

Rezultă 0,70 g compus (Mr=432,49) (randament 16%), sub forma unor cristale violet, cu T.t. 226-228°C, solubil la rece în dimetilsulfoxid, cloroform, dimetilformamidă și acetonă, insolubil în apă și etanol la rece.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

Analiza FT-IR (KBr, v cm⁻¹): 3086s, 3065s, 3027s, 2911s, 2861s, 1784i, 1763fi, 1644i, 1604fi, 1591i, 1571fi, 1527fi, 1371i, 1323i, 1295i, 1159fi, 1105m, 1070m, 848m.

Analiza ¹H-RMN (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8,23 (d, 8,2, 2H, H-7, H-11), 8,12 (d, 8,5, 2H, H-20, H-24), 8,11 (d, 8,2, 2H, H-8, H-10), 7,60 (t, 7,1, H-15), 7,53 (t, 7,7, 2H, H-14, H-16), 7,25 (s, 1H, H-18), 7,18 (dl, 7,7, 2H, H-13, H-17), 6,77 (d, 8,5, 2H, H-21, H-23), 3,13 (s, 6H, H-25).



Analiza APCI-MS (m/z): 433 [M+H]⁺, 389 [M+H-CO₂]⁺, 245 [C₆H₅SO₂C₆H₄CO]⁺, 134 [C₇H₅N(CH₃)₂+H]⁺, 121 [C₆H₄N(CH₃)₂+H]⁺.

Analiza UV-VIZ (λ_{max}, nm): 329; 504.

Analiza elementală (%): teoretic: C: 66,65; H: 4,66; N: 6,48; S: 7,41; experimental: C: 66,32; H: 4,58; N: 6,82; S: 7,16.

Exemplul 2. Sinteza 2-(4-(4-clorofenilsulfonil)fenil)-4-(4-(dimetilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onei (I.1b)

Formula moleculară: $C_{24}H_{19}ClN_2O_4S$

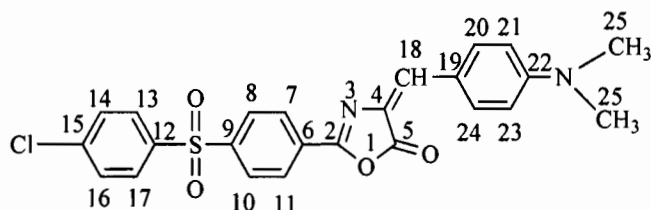
Compusul se prepară prin procedeul descris în **exemplul 1** fiind necesari următorii reactanți: 3,54 g (10 mmoli) acid 2-(4-(4-clorofenilsulfonil)benzamido)acetic ($M_r=353,78$), 1,49 g (10 mmoli) 4-(dimetilamino)benzaldehydă ($M_r=149,19$), 0,82 g (10 mmoli) acetat de sodiu ($M_r=82,03$) și 18,9 mL (20,42 g; 200 mmoli) anhidridă acetică ($M_r=102,09$; $d_4^{20} = 1,082$).

Rezultă 1,73 g compus ($M_r=466,94$) (randament 37%), sub forma unei pulberi violet, cu T.t. 258-260°C, solubil la rece în dimetilsulfoxid, cloroform, dimetilformamidă și acetonă, insolubil în apă și etanol la rece.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

Analiza FT-IR (KBr, ν cm^{-1}): 3086m, 3063m, 3030s, 2904m, 2861s, 1789fi, 1764fi, 1637fi, 1605fi, 1568fi, 1525fi, 1327fi, 1293fi, 1157fi, 1090i, 1071m, 849i, 762i.

Analiza 1H -RMN ($CDCl_3$, δ ppm, J Hz): 8,25 (d, 8,2, 2H, H-7, H-11), 8,13 (d, 8,0, 2H, H-20, H-24), 8,04 (d, 7,8, 2H, H-8, H-10), 7,91 (d, 8,2, 2H, H-13, H-17), 7,57 (d, 8,2, 2H, H-14, H-16), 7,26 (s, 1H, H-18), 6,82 (d, 8,2, 2H, H-21, H-23), 3,14 (s, 6H, H-25).



Analiza APCI-MS (m/z): 467 [^{35}Cl M+H] $^+$, 469 [^{37}Cl M+H] $^+$, 439 [^{35}Cl M+H-CO] $^+$, 441 [^{37}Cl M+H-CO] $^+$, 423 [^{35}Cl M+H-CO $_2$] $^+$, 425 [^{37}Cl M+H-CO $_2$] $^+$, 279 [$^{35}ClC_6H_4SO_2C_6H_4CO$] $^+$, 281 [$^{37}ClC_6H_4SO_2C_6H_4CO$] $^+$, 188 [M+H- $^{35}ClC_6H_4SO_2C_6H_4CO$] $^+$, 190 [M+H- $^{37}ClC_6H_4SO_2C_6H_4CO$] $^+$.

Analiza UV-VIZ (λ_{max} , nm): 331; 506.

Analiza elementală (%): teoretic: C: 61,73; H: 4,10; N: 6,00; S: 6,87; experimental: C: 61,81; H: 4,13; N: 5,91; S: 6,95.

Exemplul 3. Sinteza 2-(4-(4-bromofenilsulfonil)fenil)-4-(4-(dimetilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onei (I.1c)

Formula moleculară: $C_{24}H_{19}BrN_2O_4S$

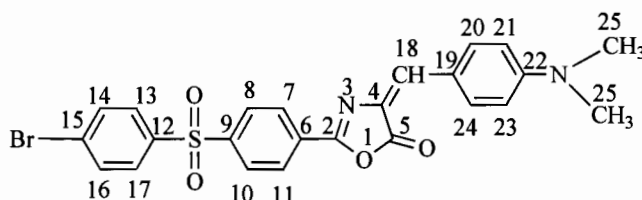
Compusul se prepară prin procedeul descris în **exemplul 1** fiind necesari următorii reactanți: 3,98 g (10 mmoli) acid 2-(4-(4-bromofenilsulfonil)benzamido)acetic ($M_r=398,23$), 1,49 g (10 mmoli) 4-(dimetilamino)benzaldehydă ($M_r=149,19$), 0,82 g (10 mmoli) acetat de sodiu ($M_r=82,03$) și 18,9 mL (20,42 g; 200 mmoli) anhidridă acetică ($M_r=102,09$; $d_4^{20} = 1,082$).

Rezultă 2,05 g compus ($M_r=511,39$) (randament 40%), sub forma unei pulberi violet, cu T.t. 297-299°C, solubil la rece în dimetilsulfoxid, cloroform, dimetilformamidă și acetonă, insolubil în apă și etanol la rece.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

Analiza FT-IR (KBr, ν cm^{-1}): 3084m, 3090s, 2909m, 2860s, 1789i, 1760fi, 1690m, 1637i, 1605fi, 1569fi, 1525fi, 1381fi, 1327fi, 1289i, 1160fi, 1069i, 894i, 611fi, 576i.

Analiza $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 8,25 (d, 8,5, 2H, H-7, H-11), 8,14 (d, 8,4, 2H, H-20, H-24), 8,04 (d, 8,5, 2H, H-8, H-10), 7,80 (d, 8,8, 2H, H-13, H-17), 7,68 (d, 8,5, 2H, H-14, H-16), 7,25 (s, 1H, H-18), 6,87 (d, 8,4, 2H, H-21, H-23), 3,14 (s, 6H, H-25).



Analiza APCI-MS (m/z): 511 [^{79}Br $\text{M}+\text{H}$] $^+$, 513 [^{81}Br $\text{M}+\text{H}$] $^+$, 467 [^{79}Br $\text{M}+\text{H}-\text{CO}_2$] $^+$, 469 [^{81}Br $\text{M}+\text{H}-\text{CO}_2$] $^+$, 323 [^{79}Br $\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}$] $^+$, 325 [^{81}Br $\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}$] $^+$, 188 [$\text{M}+\text{H}-\text{Br}$ $\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}$] $^+$.

Analiza UV-VIZ (λ_{max} , nm): 331; 506.

Analiza elementală (%): teoretic: C: 56,37; H: 3,74; N: 5,48; S: 6,27; experimental: C: 56,44; H: 3,45; N: 5,59; S: 6,52.

Exemplul 4. Sinteza 4-(4-(diethylamino)benziliden)-2-(4-(fenilsulfonyl)fenil)oxazol-5(4H)-onei (I.2a)

Formula moleculară: $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$

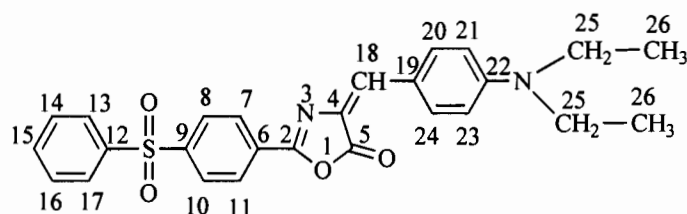
Compusul se prepară prin procedeul descris în **exemplul 1** fiind necesari următorii reactanți: 3,19 g (10 mmoli) acid 2-(4-(fenilsulfonyl)benzamido)acetic ($M_r=319,33$), 1,77 g (10 mmoli) 4-(diethylamino)benzaldehydă ($M_r=177,24$), 0,82 g (10 mmoli) acetat de sodiu ($M_r=82,03$) și 18,9 mL (20,42 g; 200 mmoli) anhidridă acetică ($M_r=102,09$; $d_4^{20} = 1,082$).

Rezultă 1,52 g compus ($M_r=460,54$) (randament 33%), sub forma unei pulberi violet, cu T.t. 264-265°C, solubil la rece în dimetilsulfoxid, cloroform, dimetilformamidă și acetonă, insolubil în apă și etanol la rece.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

Analiza FT-IR (KBr, ν cm^{-1}): 3062m, 2969m, 2926m, 2873s, 1786i, 1758fi, 1639fi, 1592fi, 1521fi, 1327fi, 1295fi, 1274fi, 1157fi, 1082i, 845i.

Analiza ¹H-RMN (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8,21 (d, 8,1, 2H, H-7, H-11), 8,10 (m, 2H, H-20, H-24), 8,01 (d, 8,1, 2H, H-8, H-10), 7,98 (dl, 7,4, 2H, H-13, H-17), 7,58 (dl, 7,0, 1H, H-15), 7,55 (t, 7,5 2H, H-14, H-16), 7,23 (s, 1H, H-18), 6,71 (d, 8,3, 2H, H-21, H-23), 3,47 (q, 6,8, 4H, H-25), 1,24 (t, 6,8, 6H, H-26).



Analiza ESI-MS (m/z): 461 [M+H]⁺, 433 [M+H-C₂H₄]⁺, 245 [C₆H₅SO₂C₆H₄CO]⁺, 188 [NHCCHC₆H₄N(C₂H₅)₂]⁺.

Analiza UV-VIZ (λ_{max}, nm): 333; 514.

Analiza elementală (%): teoretic: C: 67,81; H: 5,25; N: 6,08; S: 6,96; experimental: C: 67,69; H: 5,58; N: 6,32; S: 6,90.

Exemplul 5. Sinteza 2-(4-(4-clorofenilsulfonil)fenil)-4-(4-(dietilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onei (I.2b)

Formula moleculară: C₂₆H₂₃ClN₂O₄S

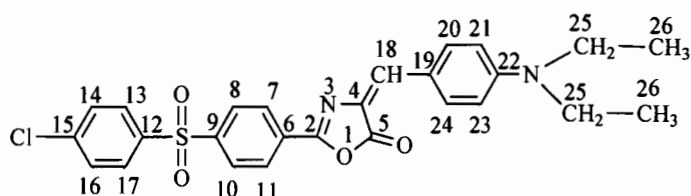
Compusul se prepară prin procedeul descris în **exemplul 1** fiind necesari următorii reactanți: 3,53 g (10 mmoli) acid 2-(4-(4-clorofenilsulfonil)benzamido)acetic (Mr=353,78), 1,77 g (10 mmoli) 4-(dietilamino)benzaldehydă (Mr=177,24), 0,82 g (10 mmoli) acetat de sodiu (Mr=82,03) și 18,9 mL (20,42 g; 200 mmoli) anhidridă acetică (Mr=102,09; d₄²⁰= 1,082).

Rezultă 1,63 g compus (Mr=494,99) (randament 33%), sub forma unei pulberi roșie-portocalie, cu T.t. 233-235°C, solubil la rece în dimetilsulfoxid, cloroform, dimetilformamidă și acetonă, insolubil în apă și etanol la rece.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

Analiza FT-IR (KBr, ν cm⁻¹): 3082s, 3040s, 2973m, 2934s, 2898s, 2875s, 1789i, 1771fi, 1642i, 1605fi, 1575fi, 1522fi, 1323i, 1272i, 1156fi, 1082i, 847m, 767i.

Analiza ¹H-RMN (CDCl₃, δ ppm, J Hz): 8,21 (d, 8,2, 2H, H-7, H-11), 8,10 (m, 2H, H-20, H-24), 8,01 (d, 8,2, 2H, H-8, H-10), 7,89 (d, 8,5, 2H, H-13, H-17), 7,49 (d, 8,5, 2H, H-14, H-16), 7,23 (s, 1H, H-18), 6,71 (d, 8,2, 2H, H-21, H-23), 3,46 (q, 6,8, 4H, H-25), 1,23 (t, 6,8, 6H, H-26).



Analiza ESI-MS (m/z): 495 [$^{35}\text{Cl M}+\text{H}$] $^+$, 497 [$^{37}\text{Cl M}+\text{H}$] $^+$, 467 [$^{35}\text{Cl M}+\text{H}-\text{CO}$] $^+$, 469 [$^{37}\text{Cl M}+\text{H}-\text{CO}$] $^+$, 279 [$^{35}\text{ClC}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}$] $^+$, 281 [$^{37}\text{ClC}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}$] $^+$, 188 [$\text{NHCCHC}_6\text{H}_4\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$] $^+$.

Analiza UV-VIZ (λ_{max} , nm): 336; 515.

Analiza elementală (%): teoretic: C: 63,09; H: 4,68; N: 5,66; S: 6,48; experimental: C: 63,33; H: 4,96; N: 5,31; S: 6,38.

Exemplul 6. Sinteza 2-(4-(4-bromofenilsulfonyl)fenil)-4-(4-(dietilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onei (I.2c)

Formula moleculară: $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{BrN}_2\text{O}_4\text{S}$

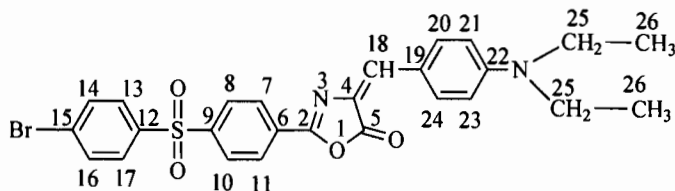
Compusul se prepară prin procedeul descris în **exemplul 1** fiind necesari următorii reactanți: 3,98 g (10 mmoli) acid 2-(4-(4-bromofenilsulfonyl)benzamido)acetic ($\text{Mr}=398,23$), 1,77 g (10 mmoli) 4-(diethylamino)benzaldehydă ($\text{Mr}=177,24$), 0,82 g (10 mmoli) acetat de sodiu ($\text{Mr}=82,03$) și 18,9 mL (20,42 g; 200 mmoli) anhidridă acetică ($\text{Mr}=102,09$; $d_4^{20}=1,082$).

Rezultă 1,62 g compus ($\text{Mr}=539,44$) (randament 30%), sub forma unei pulberi portocalii, cu T.t. 232-234°C, solubil la rece în dimetilsulfoxid, cloroform, dimetilformamidă și acetonă, insolubil în apă și etanol la rece.

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

Analiza FT-IR (KBr, ν cm^{-1}): 3081m, 3063s, 3039s, 2972m, 2933m, 2896s, 2874s, 1789fi, 1770fi, 1643fi, 1605fi, 1575fi, 1521fi, 1322fi, 1272fi, 1156fi, 1081m, 848m, 625i, 569i.

Analiza $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ ppm, J Hz): 8,23 (d, 8,4, 2H, H-7, H-11), 8,10 (m, 2H, H-20, H-24), 8,02 (d, 8,4, 2H, H-8, H-10), 7,84 (d, 8,5, 2H, H-13, H-17), 7,67 (d, 8,5, 2H, H-14, H-16), 7,25 (s, 1H, H-18), 6,72 (d, 8,6, 2H, H-21, H-23), 3,47 (q, 6,8, 4H, H-25), 1,24 (t, 6,8, 6H, H-26).



Analiza ESI-MS (m/z): 539 [$^{79}\text{Br M}+\text{H}$] $^+$, 541 [$^{81}\text{Br M}+\text{H}$] $^+$, 511 [$^{79}\text{Br M}+\text{H}-\text{C}_2\text{H}_4$] $^+$, 513 [$^{81}\text{Br M}+\text{H}-\text{C}_2\text{H}_4$] $^+$, 188 [$\text{NHCCHC}_6\text{H}_4\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$] $^+$.

Analiza UV-VIZ (λ_{max} , nm): 335; 516.

Analiza elementală (%): teoretic: C: 57,89; H: 4,30; N: 5,19; S: 5,94; experimental: C: 57,55; H: 4,17; N: 5,28; S: 5,86.

Spectroscopia de fluorescență a 4-(4-(dialchilamino)benziliden)-2-(4-(4-X-fenilsulfonil)-fenil)oxazol-5(4H)-onelor

Compușii cu formula generală I prezintă un maxim de absorbție în UV în jurul valorii de 334 nm și în vizibil în jurul valorii de 510 nm, motiv pentru care au fost înregistrate spectrele de emisie ale acestora la lungimile de undă de excitație 334 nm și, respectiv 510 nm.

Spectrele de emisie au fost înregistrate cu un cititor de plăci multimodal Thermo Scientific Varioskan Flash, utilizând incrementele de 5 nm pentru toate determinările.

Excitația la lungimea de undă de 334 nm duce la obținerea spectrelor de emisie care arată o fluorescență foarte slabă sau aproape nulă în domeniul spectral 350-450 nm.

Excitația la lungimea de undă de 510 nm duce la obținerea spectrelor de emisie, care arată o fluorescență pentru toți compușii în domeniul 550-700 nm.

Spectrele de fluorescență în domeniul 550-700 nm pentru compușii I.1a-c și I.2a-c sunt prezentate în figura 1.

Evaluarea tolerabilității drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* la incubarea cu noii compuși

Având în vedere că unul din factorii de care depinde utilizarea oxazol-5(4H)-onelor cu formula generală I în bioimagică este tolerabilitatea celulelor vii față de acești potențiali marcatori celulari fluorescenți, s-a decis incubarea drojdiei *S. cerevisiae* în contact cu soluții ale acestor compuși de diferite concentrații în DMSO. S-a ales ca solvent DMSO întrucât acesta este biocompatibil cu celulele.

Metodologie

Tulpini fungice și condiții de creștere

Tulpina de *S. cerevisiae* utilizată în cadrul acestui studiu a fost BY4741 (*MATa*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*) și a fost achiziționată de la EUROSCARF, Frankfurt, Germany. Stocarea celulelor, metoda de cultivare și manipularea acestora a fost realizată conform procedurilor uzuale [Sherman, F., „Getting started with yeast, Methods enzymology”, 350, 2002, 3-41].

Tulpinile fungice au fost crescute în mediu complet YPD (1% m/v extract de drojdie, 2% m/v peptonă, 2% m/v glucoză) sau în mediu sintetic SC (0,67% m/v sursă de azot cu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ și fără aminoacizi, 2% glucoză, suplimentat cu aminoacizii necesari). Soluțiile în DMSO ale noilor

oxazolone, obținute din soluții stoc (20mM) sterilizate prin filtrare (Millipore, pori 0,22 μm), au fost adăugate peste suspensia celulară.

*Evaluarea creșterii celulelor de *S. cerevisiae**

Pre-culturi crescute peste noapte în YPD au fost inoculate în mediu SC la densitatea 2×10^5 celule/mL. Ulterior, celulele au fost incubate 2 ore sub agitare (200 rpm, 30°C) într-un incubator cu agitare orbitală (Shanghai ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co, Ltd., China), după care au fost adăugate soluțiile compușilor testați la concentrațiile dorite, obținute dintr-o soluție stoc 20 mM în DMSO. Creșterea celulară a fost determinată măsurând turbiditatea suspensiei celulare la 660 nm, utilizând un spectrofotometru UV-Viz Mini (Shimadzu, Japonia) [Amberg, D.C. și colab., „Measuring yeast cell density by spectrophotometry. In D. Burke, D. Dawson, & T. Stearns (Eds.), „Methods in yeast genetics. A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual”, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005, 163-165]. Creșterea celulară a fost calculată procentual față de martorul reprezentat de celulele crescute în prezența DMSO, fără compus.

Rezultatele obținute în cazul compușilor **I.1a-c**:

- la concentrația de 0,1 mM, creșterea culturii de *S. cerevisiae* raportată la control a fost următoarea: **I.1a**–88,3%; **I.1b**–94,9%; **I.1c**–79,3%;
- la concentrația de 1 mM, creșterea culturii de *S. cerevisiae* raportată la control a fost următoarea: **I.1a**–56,3%; **I.1b**–90,3%; **I.1c**–93,2%.

Rezultatele obținute în cazul compușilor **I.2a-c**:

- la concentrația de 0,1 mM, creșterea culturii de *S. cerevisiae* raportată la control a fost următoarea: **I.2a**–95,3%; **I.2b**–97,2%; **I.2c**–88,9%;
- la concentrația de 1 mM, creșterea culturii de *S. cerevisiae* raportată la control a fost următoarea: **I.2a**–72,5%; **I.2b**–87,4%; **I.2c**–83,1%.

Analizând rezultatele care reprezintă media a trei experimente diferite, se observă că cei 6 compuși testați prezintă o toxicitate scăzută și deci, o tolerabilitate bună a drojdiei față de aceștia.

Localizarea la nivel celular a noilor compuși în celulele de *Saccharomyces cerevisiae*

Ținând cont de toxicitatea redusă a compușilor asupra celulelor de *S. cerevisiae* precum și de proprietățile lor fluorescente, s-a testat posibilitatea acestora de a fi utilizați ca marcatori celulari fluorescenți.

Metodologie

În acest scop, celulele de *S. cerevisiae* au fost inoculate dintr-o pre-cultură în mediu SD lichid și crescute sub agitare (200 rpm, 30°C) până la 5×10^6 celule/mL (faza timpurie de creștere exponențială) după care au fost adăugați compușii la concentrația finală 50 μ M din soluții stoc în DMSO (10 mM). Celulele au fost co-marcate cu colorantul 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI-0,01 μ g/mL) pentru vizualizarea nucleului și a mitocondriilor. Celulele au fost incubate cu compușii testați încă 2 ore înainte de a fi vizualizate cu un microscop de fluorescență Olympus (Olympus BX53, Japan) echipat cu lampă de mercur HBO-100 și cameră Olympus DP73. Pentru a detecta semnalele de fluorescență ale compușilor s-a utilizat un set de filtre GFP (filtru de excitare 460-480 nm cu prismă dicromatică 505 nm, filtru de emisie 510-550 nm), iar pentru a detecta semnalele DAPI s-a utilizat un set de filtre de excitație 340-390 nm, prismă dicromatică 410 nm, filtru de emisie 420 nm (la care emisia compușilor este minimă).

Pentru compusul **I.1a** s-a observat o fluorescență verde care sugerează o localizare citosolică a acestuia.

În cazul compusului **I.1b** fluorescența verde a fost mult mai slabă, însă a sugerat o localizare citosolică a acestuia. Semnalul mult mai slab de fluorescență în cazul compusului **I.1b** poate fi cauzat de o acumulare intracelulară mai mică.

Pentru compusul **I.1c** s-a observat o fluorescență verde care de asemenea sugerează o localizare citosolică, dar și o concentrare a compusului la nivelul nucleului (figura 2). Faptul că **I.1c** este concentrat la nivelul nucleului sugerează o eventuală interacțiune a acestuia cu ADN-ul, dar într-o manieră lipsită de citotoxicitate.

În cazul compusului **I.2a** s-a observat o fluorescență verde care de asemenea sugerează o localizare citosolică, dar și o concentrare a acestuia la nivelul nucleului.

Pentru compusul **I.2b** s-a remarcat o fluorescență verde care indică o localizare citosolică și concentrare mult mai slabă la nivelul nucleului.

S-a constatat că fluorescența verde a compusului **I.2c** se concentrează la nivelul nucleului.

Se poate concluziona că noile oxazol-5(4H)-one sintetizate nu sunt toxice pentru *S. cerevisiae*. Studiile de fluorescență și de localizare intracelulară au indicat faptul că majoritatea compușilor se regăsesc în citoplasma celulelor de *S. cerevisiae*, iar **I.1c**, **I.2a** și **I.2c** difuzează și în nucleu.

Studiul încorporării noilor compuși în celule umane normale și tumorale

Studiul *in vitro* a fost realizat pe celule tumorale umane epiteliale colorectale din liniile HT-29 (adenocarcinom, ATCC[®]HTB-38[™]) și HCT116 (carcinom colorectal, ATCC[®]CCL-247[™]), și celule

umane de tip glioblastom din linia U-87MG (ATCC[®]HTB-14[™]). În paralel, s-au realizat investigații pe celule umane proliferative netumorale de tipul monocitelor din linia CRL9855 (ATCC[®]CRL9855[™]).

Celulele tumorale HT-29 sunt celule epiteliale de adenocarcinom colorectal uman, aderente, care se aseamănă cu enterocitele din intestinul subțire [Forgue-Lafitte, M.E. și colab., „Proliferation of the Human Colon Carcinoma Cell Line HT-29: Autocrine Growth and Deregulated Expression of the c-myc Oncogene”, *Cancer Res.*, 1989, 49, 6566-6571]. Celulele tumorale HCT116 sunt celule epiteliale de carcinom colorectal uman, aderente, care sunt utilizate în numeroase studii privind proliferarea celulară în cancerul de colon, dar și pentru testarea unor potențiali inhibitori ai progresiei acestui tip de carcinom [Xia, D. și colab., „Knockout of MARCH2 inhibits the growth of HCT116 colon cancer cells by inducing endoplasmic reticulum stress”, *Cell Death Dis.*, 2017, e2957]. Spre deosebire de linia HCT116, linia HT-29 este mai puțin agresivă, având o dezvoltare mai lentă.

Linia celulară U-87MG este o linie celulară tumorală utilizată pentru investigația unor inhibitori potențiali ai dezvoltării glioblastomului uman, una dintre cele mai agresive forme de cancer la nivelul creierului [Witthayanuwat, S. și colab., „Survival Analysis of Glioblastoma Multiforme”, *Asian Pac. J. Cancer. Prev.*, 2018, 19(9), 2613-2617].

Metodologie

Celulele au fost menținute în cultură conform indicațiilor furnizorului (American Tissue and Cell Collection, ATCC, SUA). Astfel, celulele tumorale aderente au fost menținute în mediu de cultură DMEM-F12 (Gibco), suplimentat cu ser fetal bovin (Merck) și soluție de antibiotic-antimicotic (Sigma). Pasajul celular s-a realizat de 2-3 ori pe săptămână, prin tripsinizare cu o soluție de tripsină/EDTA(0,25%/0,02%, Biochrom). Monocitele din linia CRL9855 (celule neaderente) au fost cultivate în mediu de cultură IMDM (Thermo Fisher Scientific), suplimentat cu soluție HT 100x (10 mM hipoxantină sodică și 1,6 mM timidină), (Thermo Fisher Scientific), 0,05 mM 2-mercaptoetanol (Sigma) și 10% ser fetal bovin (Merck).

Datorită proprietăților fluorescente ale compușilor testați, încorporarea acestora în celule s-a putut determina prin citometrie în flux, ca fluorescență medie intracelulară.

Celulele monocitare umane netumorale (linia celulară ATCC[®]CRL-9855[™]), celulele de carcinom colorectal din liniile HT-29 și HCT116, ca și celulele de glioblastom U-87MG au fost cultivate și tratate cu soluții ale compușilor testați, care au fost realizate inițial în DMSO la o concentrație de 20 mM, fiind apoi diluate în mediu de cultură complet, cu agitare viguroasă pe vortex. Alegerea

DMSO pentru prepararea soluțiilor destinate testelor *in vitro* este justificată de faptul că noii compuși prezintă o solubilitate bună în acest solvent biocompatibil la diluții <1/500 în mediu de cultură.

Celulele tumorale au fost cultivate în plăci de cultură de 24 godeuri, pornind de la 5×10^4 celule/godeu, și au fost lăsate 24 ore să adere la placă și să înceapă să prolifereze. Ulterior, s-au adăugat substanțele de testat la concentrațiile dorite. În cazul celulelor netumorale, neaderente, din linia CRL9855, s-au realizat sisteme experimentale conținând $0,5 \times 10^6$ celule/mL și compușii de testat la concentrațiile dorite. Probele cu celule netratate cu compuși fluorescenți au fost utilizate pentru a stabili nivelul de fluorescență intrinsecă a celulelor (autofluorescență).

După încărcare cu compuși, celulele tumorale aderente au fost tripsinizate cu o soluție de tripsină/EDTA (0,25%/0,02%) (Biochrom) și pregătite pentru citirea la citometrul în flux.

În cazul celulelor netumorale neaderente din linia CRL9855, acestea au fost centrifugate (1200 rpm, 5 min, 4°C), s-a îndepărtat supernatantul, apoi celulele au fost pregătite pentru citirea la citometrul în flux.

Fluorescența intracelulară datorată încorporării compușilor testați s-a măsurat prin citometrie în flux cu citometrul FACSCanto (Becton Dickinson), utilizând excitarea cu laserul de 488 nm și emisia în canalul de fluorescență FL2-oranj. Achiziția și prelucrarea datelor s-a realizat cu programul FACSDiva. Pentru fiecare probă s-au achiziționat minim 10000 de evenimente.

1. Evaluarea încorporării noilor compuși fluorescenți în celulele monocitare umane CRL9855

Într-o primă fază s-a investigat încorporarea noilor compuși, la concentrația de 20 μ M, în monocite umane CRL9855, în raport cu un control care a conținut celule netratate cu oxazolone.

În figura 3 se prezintă încorporarea noilor compuși în monocite umane din linia CRL9855, evaluată prin citometrie în flux (excitare la 488 nm și emisie în canalul de fluorescență FL2). Rezultatele sunt prezentate ca procent de celule cu fluorescență pozitivă (mai mare decât autofluorescența celulelor netratate cu oxazolone).

Din datele experimentale prezentate în figura 3 se observă că oxazolonele **I.2b** și **I.2c** sunt încorporate de majoritatea celulelor monocitare, 80-90% dintre celule prezentând fluorescență pozitivă. Compușii **I.1b** și **I.1c** se încorporează mai puțin în monocite, doar 40-50% dintre celule prezentând fluorescență pozitivă. Dintre compușii testați, **I.1a** și **I.2a** au prezentat cea mai mică eficiență de încorporare, ceea ce indică faptul că derivații nesubstituiți cu halogeni pe nucleul arilsulfonilfenilnu se încorporează eficient în monocitele umane proliferative.

2. Evaluarea încorporării noilor compuși fluorescenți în celulele tumorale

Dat fiind gradul diferit de încorporare al compușilor testați în celule netumorale proliferative din linia CRL9855, următoarea etapă a constat în investigarea încorporării substanțelor sintetizate, la concentrația 20 μM , în celule tumorale aderente din liniile HT-29, HCT116 și U-87MG.

Într-o primă etapă, noii compuși au fost testați comparativ pe linia tumorală umană de carcinom colorectal HCT116 și pe linia tumorală de glioblastom U-87MG.

În figura 4 se prezintă fluorescența celulelor tumorale umane din linia HCT116 (carcinom colorectal) și U-87MG (glioblastom) incubate 24 ore cu oxazolonele testate la concentrația de 20 μM . Evaluarea fluorescenței intracelulare s-a realizat prin citometrie în flux (excitare la 488 nm și emisie în canalul de fluorescență FL2). Rezultatele sunt prezentate ca procent de celule fluorescente (a) și ca intensitate medie de fluorescență (b).

Conform datelor din figura 4, aproape toate celulele HCT116 care au fost incubate cu compușii **I.1c** și **I.2a-c** au prezentat fluorescență pozitivă. La incubarea celulelor canceroase cu compușii **I.1a** și **I.1b** s-au observat procente mai mici de celule marcate fluorescent, cel mai mic procent înregistrându-se în cazul celulelor incubate cu derivatul **I.1a**, care din punct de vedere structural nu conține un halogen pe fragmentul arilsulfonilfenil.

În cazul celulelor de glioblastom uman din linia U-87MG, procentul de celule cu fluorescență pozitivă este mai mic decât în cazul celulelor de carcinom colorectal din linia HCT116. Se remarcă faptul că un procent de aproximativ 80% din celulele U-87MG incubate cu compușii **I.1c**, **I.2b** și **I.2c** prezintă fluorescență pozitivă, iar procentul scade semnificativ atunci când celulele au fost incubate cu compușii **I.1a** și **I.2a**. Prin urmare, se observă că derivații nesubstituiți cu halogen pe fragmentul arilsulfonilfenil nu se încorporează eficient în celulele U-87MG, fapt evident și în cazul încorporării în monocitele umane proliferative (figura 3).

Se constată de asemenea că oxazolonele **I.1a** și **I.2a** marchează semnificativ mai multe celulele tumorale de carcinom colorectal și de glioblastom (figura 4a), decât celulele netumorale proliferative din linia monocitară (figura 3).

Analizând intensitatea medie de fluorescență/celulă în cazul celulelor tumorale (figura 4b), se observă faptul că toți derivații din seria **I.1a-c** și derivatul **I.2a** se încorporează foarte slab. Pe de altă parte, compușii **I.2b** și **I.2c** se încorporează foarte bine în celule (valori semnificativ mai mari ale fluorescenței medii în celulele tratate comparativ cu celulele netratate). Compusul **I.2b** nu discriminează între celulele de carcinom colorectal și de glioblastom, însă compusul **I.2c** determină o intensitate medie de fluorescență intracelulară semnificativ mai mare în celulele de glioblastom comparativ cu celulele de carcinom colorectal HCT116.

Compușii **I.2b** și **I.2c** determină o fluorescență intracelulară semnificativ mai mare în celulele tumorale (figura 4) decât în celulele monocitare netumorale investigate (figura 3). Indiferent de tipul de celule analizat, fluorescența medie a celulelor incubate cu derivatul **I.2c** este mai mare decât fluorescența celulelor incubate cu derivatul **I.2b**.

Ținând cont de rezultatele preliminare obținute prin citometrie în flux, în continuare s-a realizat studiul mai detaliat al oxazolonelor **I.2b** și **I.2c** pentru a analiza comparativ procentul de celule tumorale din liniile HT-29, HCT116 și U-87MG în care se încorporează, cât și gradul de încorporare în funcție de concentrația compușilor.

În figura 5 se prezintă analiza comparativă a fluorescenței celulelor tumorale umane din liniile HT-29, HCT116 și U-87MG, incubate 24 ore cu derivații **I.2b** și **I.2c** la concentrația de 20 μ M. Evaluarea fluorescenței intracelulare s-a realizat prin citometrie în flux (excitare la 488 nm și emisie în canalul de fluorescență FL2-oranj). Rezultatele sunt prezentate ca procent de celule fluorescente (a) și ca intensitate medie de fluorescență (b).

După cum se observă din figura 5a mai mult de 95% din celulele HCT116 incubate cu compușii **I.2b** și **I.2c** prezintă fluorescență pozitivă. Celulele HT-29 prezintă fluorescență pozitivă în proporție de aproximativ 90%, pe când celulele de glioblastom prezintă fluorescență pozitivă într-un procent de aproximativ 80%.

Deși procentul de celule fluorescente incubate în prezența oxazolonelor **I.2b** și **I.2c** a fost cel mai mic în cazul celulelor U-87MG, intensitatea medie de fluorescență/celulă a fost cea mai mare în cazul acestui tip de celule tumorale, și semnificativ mai mică în cazul celulelor HT-29 (figura 5b).

Evaluarea citotoxicității noilor compuși I.2b și I.2c asupra celulelor umane

Metodologie

Evaluarea viabilității celulelor umane tumorale (de carcinom de colon HT-29 și de carcinom de colon HCT116) și a celulelor netumorale proliferative (CRL9855) care au fost tratate cu oxazolonele **I.2b** și **I.2c** s-a realizat prin determinarea numărului de celule metabolic active în cultură prin testul reducerii MTS care este o sare de tetrazoliu (MTS, 3-(4,5-di-metiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazoliu). Datele rezultate din testul reducerii MTS au fost coroborate cu date privind moartea celulară din punctul de vedere al integrității membranei plasmaticice celulare, obținute prin testul eliberării lactat dehidrogenazei (LDH).

Celulele tumorale investigate sunt celule aderente care au fost însămânțate în plăci de cultură cu 96 de godeuri, cu 24 ore înainte de adăugarea noilor compuși, pentru a permite aderarea celulelor la

godeu. Monocitele, nefiind aderente, au fost puse în contact imediat cu soluțiile compușilor de testat. Celulele tumorale HT-29 au fost însămânțate la 10^4 celule/godeu, celulele HCT116 la $0,5 \times 10^4$ celule/godeu, iar monocitele la 3×10^4 celule/godeu.

După 24 ore de la adăugarea oxazolonei în culturile celulare, s-au investigat efectele *in vitro* ale compușilor testați asupra viabilității/multiplicării celulare (testul reducerii MTS) și asupra integrității membranei celulare plasmatică (testul eliberării LDH).

Determinarea viabilității și multiplicării celulare s-a realizat prin testul reducerii MTS, utilizând kitul CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corporation). Testul reducerii MTS presupune înregistrarea densității optice (DO) la lungimea de undă de 492 nm față de referința de 620 nm, cu ajutorul unui cititor ELISA. Densitatea optică este direct proporțională cu numărul de celule vii (metabolic active) din cultură. Pentru fiecare probă realizată în triplicat se calculează valoarea medie a $DO \pm SEM$ (densitate optică medie \pm eroarea standard a mediei). Din valorile DO corespunzătoare probelor celulare se scade valoarea fondului obținută în probe aceluare care conțin mediu de cultură.

Determinarea efectului noilor oxazolone **I.2b** și **I.2c** asupra integrității membranei plasmatică s-a realizat prin testul eliberării LDH, utilizând kitul colorimetric CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega Corporation). Sistemul măsoară cantitativ activitatea LDH în mediul extracelular. LDH eliberat de celule în supernatantul de cultură este măsurat printr-o reacție enzimatică care are ca rezultat formarea unui compus colorat a cărui densitate optică (DO) se determină cu ajutorul unui cititor ELISA, la lungimea de undă de 490 nm. Pentru fiecare probă realizată în triplicat se calculează valoarea medie a $DO \pm SEM$ (densitate optică medie \pm eroarea standard a mediei). Din valorile DO corespunzătoare probelor celulare se scade valoarea fondului (obținută în probe aceluare care conțin mediu de cultură). Valoarea DO corectată cu valoarea fondului este o măsură a cantității de LDH eliberate de celule în spațiul extracelular și implică a lezării membranei plasmatică, fapt asociat morții celulelor prin necroză [Chan, K.F. și colab., „Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase Activity”, *Methods Mol Biol*, 2013, 979, 65-70].

1. Evaluarea citotoxicității noilor compuși I.2b și I.2c asupra celulelor netumorale proliferative

În figura 6 se prezintă efectul exercitat de oxazolonele **I.2b** și **I.2c**, la concentrația de 20 μ M, asupra reducerii MTS (a) și a eliberării LDH (b) de către celulele netumorale proliferative din linia monocitelor CRL9855. Rezultatele sunt exprimate ca densitate optică (DO) și sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de probă.

Analizând efectul compușilor testați la concentrația de 20 μM asupra viabilității/proliferării celulelor CRL9855, s-a constatat că aceștia descreșc intensitatea reducerii MTS și a eliberării LDH, fapt ce sugerează că au în principal un efect citostatic, cu alte cuvinte, de scădere a proliferării acestor celule (figura 6), fără lezarea membranei plasmatică. Efectul citostatic al acestor compuși asupra celulelor netumorale proliferative poate ridica unele probleme privind administrarea lor pe cale intravenoasă.

2. Evaluarea citotoxicității noilor compuși I.2b și I.2c asupra celulelor tumorale

Au fost investigate comparativ potențialele efecte citotoxice ale oxazolinelor I.2b și I.2c asupra celulelor tumorale din liniile de carcinom colorectal HCT116 și HT-29, având în vedere faptul că acești compuși se încorporează semnificativ în celulele HCT116 și, în mai mică măsură, în celulele HT-29 (figura 5).

În figura 7 se prezintă curbele doză-efect ale compușilor oxazolonici I.2b și I.2c asupra celulelor tumorale de carcinom colorectal din liniile HT-29 (a) și HCT 116 (b), privind efectul exercitat asupra reducerii MTS. Rezultatele sunt exprimate ca densitate optică (DO) și sunt prezentate ca medie \pm SEM pentru triplicat de probă.

Datele experimentale din figura 7 arată că derivații oxazolonici I.2b și I.2c în intervalul de concentrații 5-20 μM nu afectează reducerea MTS de către celulele HT-29 și HCT116, deci nici viabilitatea/proliferarea acestor celule. Astfel, încorporarea mai mică a compușilor în celulele tumorale HT-29 nu se datorează unor potențiale efecte citotoxice ale compușilor, ci unor proprietăți intrinseci ale acestor celule, legate posibil de internalizarea mediată de receptori sau de transportori a compușilor testați.

Au fost realizate în paralel investigații privind efectul compușilor I.2b și I.2c asupra eliberării de LDH de către celulele HT-29 și HCT116 pentru a studia impactul compușilor asupra morții celulare. Datorită faptului că aceste celule eliberează spontan cantități foarte mici de LDH, la limita de detecție a metodei (valori ale $\text{DO} \leq 0,1$), confidența în rezultatele obținute este mică și de aceea acestea nu au putut fi interpretate.

Concluzii

În cadrul acestei invenții s-au sintetizat prin metoda Erlenmeyer 6 derivați de 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă care conțin un radical arilsulfonilfenil în poziția 2 cu formula generală I.



Noile oxazolone au fost caracterizate din punct de vedere fizico-chimic, structurile lor chimice fiind confirmate prin spectrometrie de rezonanță magnetică nucleară de proton, prin spectrometrie în infraroșu și ultraviolet-vizibil, prin spectrometrie de masă și prin analiză elementală.

S-a realizat și studiul proprietăților optice, compușii prezentând fluorescență remarcabilă, fapt care a condus la investigarea potențialului lor de a marca fluorescent celule umane sau non-umane, normale sau tumorale.

Din punct de vedere al citotoxicității și tolerabilității, noile oxazolone sintetizate nu sunt toxice pentru *S. cerevisiae*, dezvoltarea drojdiei nefiind împiedicată de incubarea cu oxazolone. Studiile de fluorescență și de localizare intracelulară au indicat că majoritatea compușilor se localizează în citoplasma celulelor de *S. cerevisiae*, iar compușii **I.1c**, **I.2a** și **I.2c** difuzează și în nucleu. Prin urmare, oxazolonele **I.1c**, **I.2a** și **I.2c** pot fi luate în considerare pentru a fi dezvoltate ca marcatori pentru nucleul *S. cerevisiae*.

Compușii oxazolonic **I.2b** și **I.2c**, la concentrația de 20 μ M, au capacitatea de a marca fluorescent unele tipuri de celulele umane tumorale, cum ar fi cele de carcinom colorectal și de glioblastom, într-o măsură mult mai mare decât se realizează marcarea celulelor netumorale proliferative, cum ar fi cele monocitare. Astfel, compușii pot distinge între țesuturile tumorale și unele celule normale, fiind astfel candidați promițători pentru imagistică în patologia oncologică. Puterea imagistică a compușilor se adresează tumorilor agresive (celule de carcinom colorectal HCT116 și glioblastom U-87MG), și, în mai mică măsură, celulelor cu grad de malignitate mai scăzut (celulele de carcinom colorectal din linia HT-29).

Compușii oxazolonic **I.2b** și **I.2c** nu afectează proliferarea celulelor tumorale de colon investigate, dar tind să limiteze multiplicarea celulelor netumorale proliferative de tipul monocitelor CRL9855. Potențialele efecte citostatice ale compușilor asupra celulelor normale nu ridică probleme medicale, având în vedere că acestea vor fi administrate în doză unică pentru imagistică celulară și nu se adresează unei terapii cu doze repetitive care ar fi putut afecta semnificativ viabilitatea monocitelor din sânge.

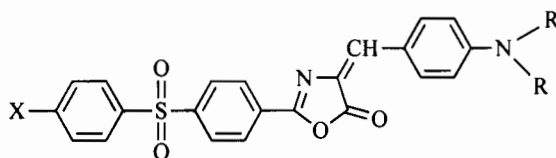
Rezultatele indică astfel că noii derivați de 4-(4-(dialchilamino)benziliden)-2-(4-(4-X-fenilsulfonil)fenil)oxazol-5(4H)-onă sunt fluorescenți, necitotoxici, fiind adecvați pentru aplicații biomedicale, ca marcatori fluorescenți pentru imagistică celulară în patologia oncologică.



Asat

Revendicări

1. Derivați de 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă care conțin un fragment arilsulfonilfenil în poziția 2, cu formula generală I:



caracterizați prin aceea că R este metil sau etil și X este H, Cl sau Br.

a) Derivat de 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă, care conține un fragment arilsulfonilfenil în poziția 2, cu formula generală I, caracterizat prin aceea că este 2-(4-(fenilsulfonil)fenil)-4-(4-(dimetilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-ona.

b) Derivat de 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă, care conține un fragment arilsulfonilfenil în poziția 2, cu formula generală I, caracterizat prin aceea că este 2-(4-(4-clorofenilsulfonil)fenil)-4-(4-(dimetilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-ona.

c) Derivat de 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă, care conține un fragment arilsulfonilfenil în poziția 2, cu formula generală I, caracterizat prin aceea că este 2-(4-(4-bromofenilsulfonil)fenil)-4-(4-(dimetilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-ona.

d) Derivat de 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă, care conține un fragment arilsulfonilfenil în poziția 2, cu formula generală I, caracterizat prin aceea că este 4-(4-(dietilamino)benziliden)-2-(4-(fenilsulfonil)fenil)oxazol-5(4H)-ona.

e) Derivat de 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă, care conține un fragment arilsulfonilfenil în poziția 2, cu formula generală I, caracterizat prin aceea că este 2-(4-(4-clorofenilsulfonil)fenil)-4-(4-(dietilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-ona.

f) Derivat de 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă, care conține un fragment arilsulfonilfenil în poziția 2, cu formula generală I, caracterizat prin aceea că este 2-(4-(4-bromofenilsulfonil)fenil)-4-(4-(dietilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-ona.

2. Derivați de 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă, care conțin un fragment arilsulfonilfenil în poziția 2, cu formula general I, definiți în revendicarea 1, necitotoxici, pentru utilizare ca marcatori celulari fluorescenți, pentru celule normale și tumorale.



$\lambda_{excit} = 510 \text{ nm}$

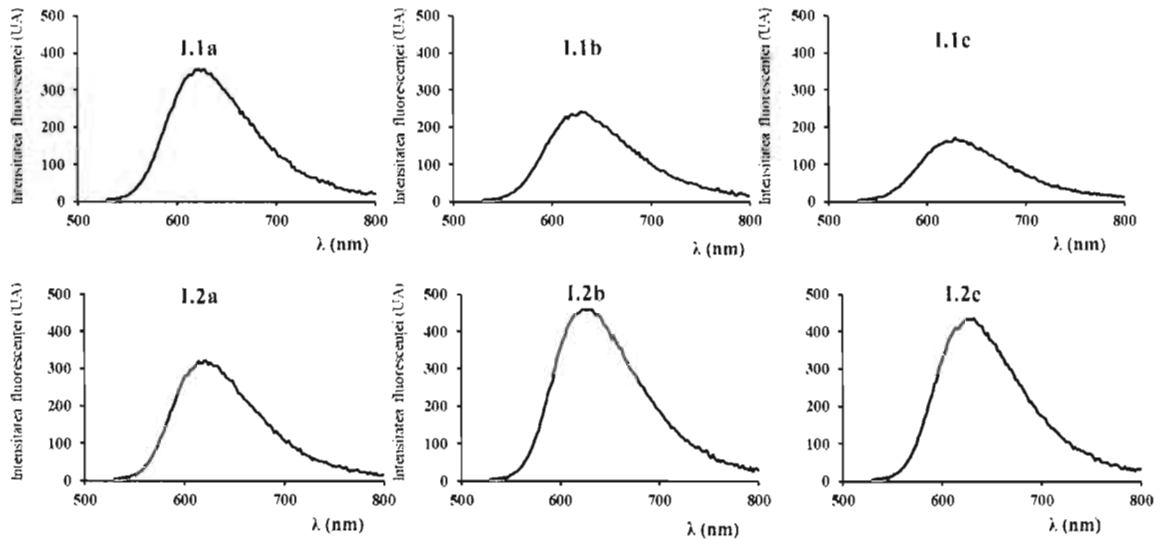


Figura 1

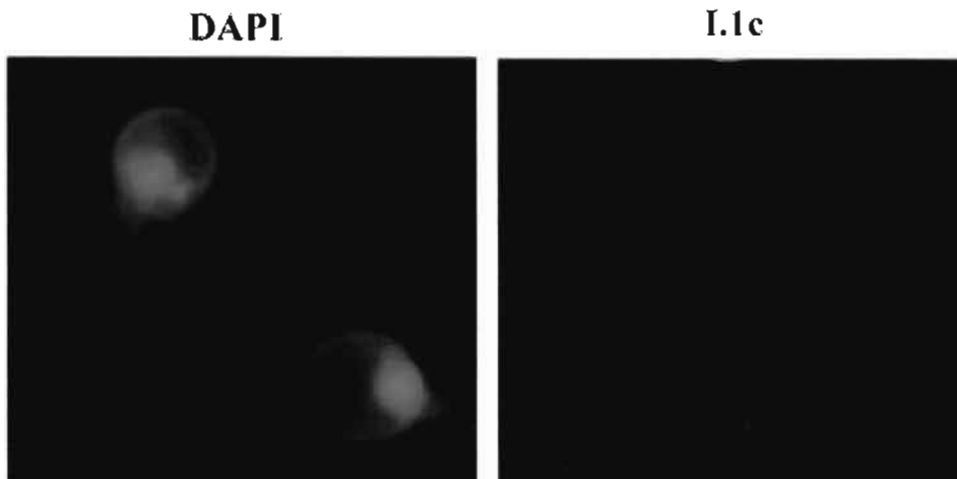


Figura 2

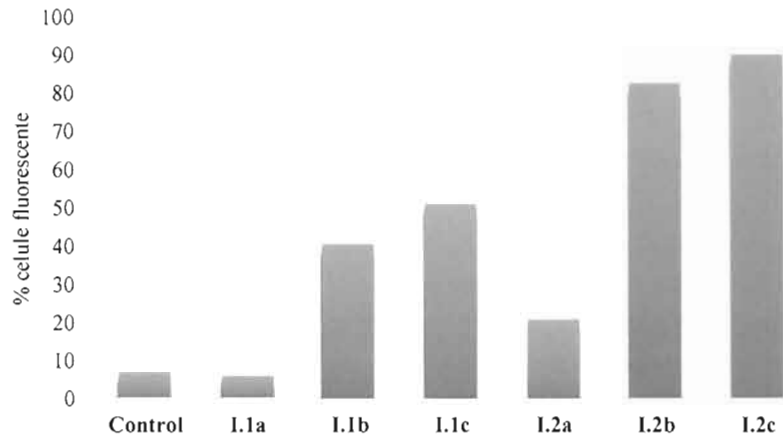


Figura 3

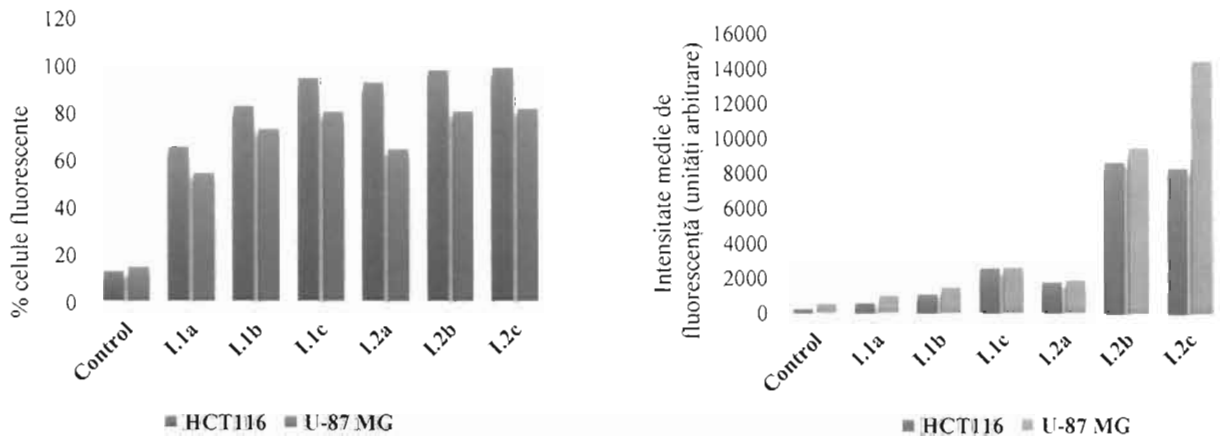


Figura 4

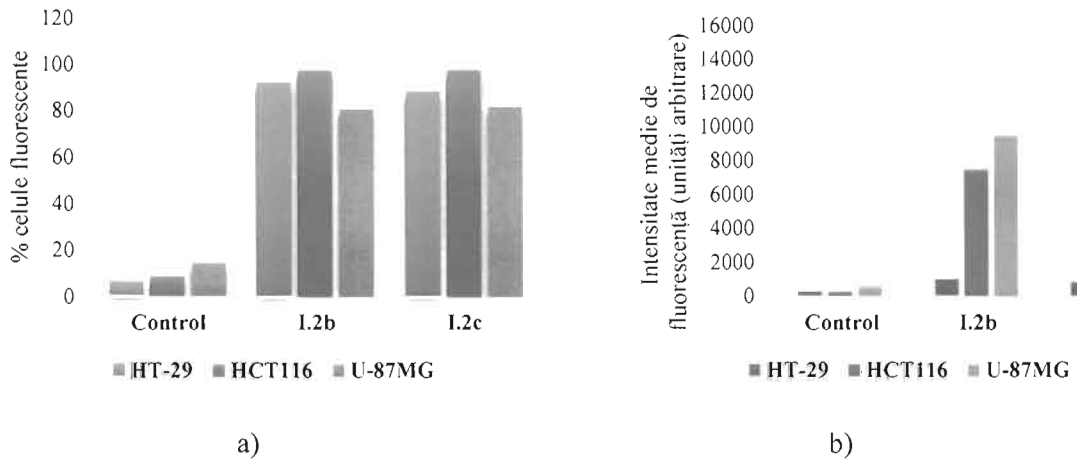


Figura 5

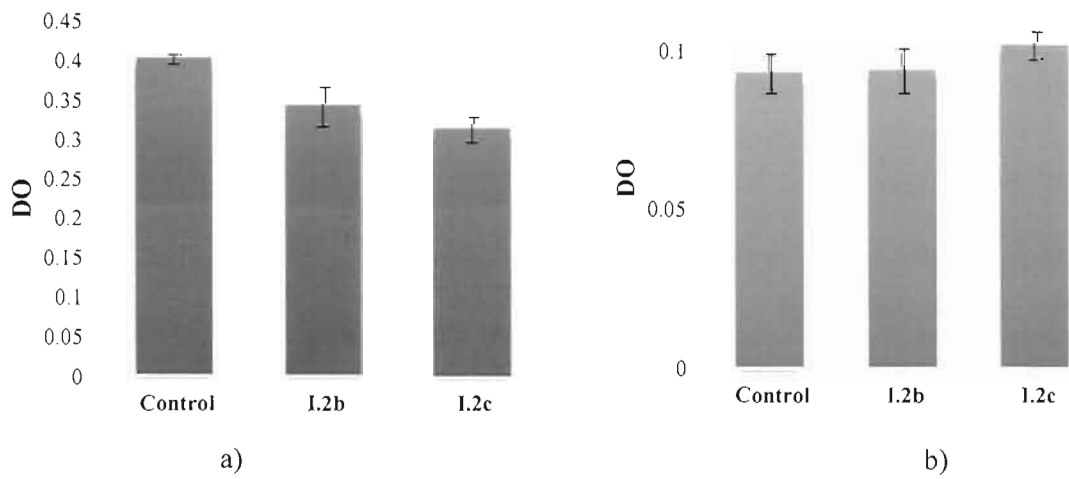
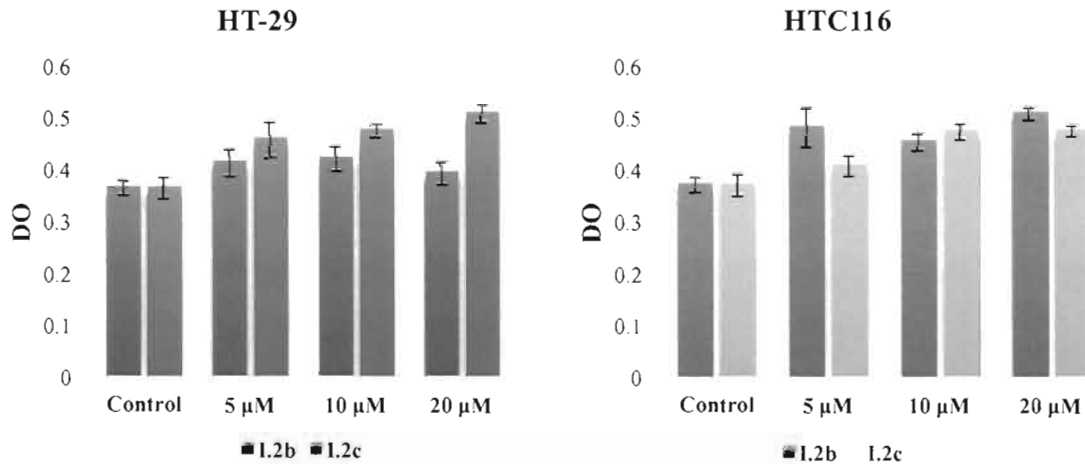


Figura 6



a)

b)

Figura 7