



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2020 00490**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/12/2022** BOPI nr. **12/2022**

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

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

(72) Inventatori:  
• **ROȘCA ELENA-VALENTINA,**  
*STR. NICOLAE BĂLCESCU, 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 PÎRVU CRISTINA ELENA,**  
*STR. GH. LAZĂR NR. 10, ET. 1, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO*

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**ROȘCA E. V. ȘI COLAB., "SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND CYTOTOXICITY EVALUATION OF NEW COMPOUNDS FROM OXAZOL-5(4H)-ONES AND 1,2,4-TRIAZIN-6(5H)-ONES CLASSES", BIOLOGY, REV. DE CHIMIE, NR. 11, VOL. 70, 2019; ROȘCA E. V. ȘI COLAB., "IN SILICO AND EXPERIMENTAL STUDIES FOR THE DEVELOPMENT OF NOVEL OXAZOL-5(4H)-ONES WITH PHARMACOLOGICAL POTENTIAL", FARMACIA, NR. 3, VOL. 68, 2020**

(54) **DERIVAȚI DE 4-(4-(DIALCHILAMINO) BENZILIDEN) OXAZOL-5(4H)-ONĂ FLUORESCENȚI CU APLICAȚII BIOMEDICALE**

Examinator: ing. MIHĂILESCU CĂTĂLINA



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

# RO 134761 B1

1           Invenția se referă la noi derivați de 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă  
care conțin un radical arilsulfonilfenil în poziția 2 și utilizarea lor în bioimagică, precum și  
3           evaluarea proprietăților fluorescente și a citotoxicității acestora.

5           Acești compuși au fost sintetizați și caracterizați din punct de vedere fizico-chimic și  
biologic cu scopul utilizării lor ca marcatori fluorescenți netoxici pentru celule tumorale  
umane. Invenția se înscrie în cadrul preocupărilor la nivel mondial pentru descoperirea unor  
7           noi agenți fluorescenți care să permită detectarea și vizualizarea celulelor tumorale, cu scop  
diagnostic sau de monitorizare a terapiei.

9           Compușii din clasa oxazol-5(4H)-onelor sunt intens studiați atât pentru proprietățile  
lor farmacologice (anticanceroase, antimicrobiene, analgezice, antiinflamatoare etc.)  
11           [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.,  
13           „*Oxazolone derivatives and uses thereof*”, US 6355641, 2002; Savariz F.C. și colab.,  
15           „*Synthesis and Evaluation of New  $\beta$ -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 &  
17           synthesis of novej oxazolone & triazinone derivatives and their biological evaluation  
as COX-2 inhibitors*”, Bioorg. Chem., 2017, 72, 308-314; Abdel-Motaleb R. M. și colab.,  
19           „*A Simple and Convenient Synthesis of 4-Ylidene-5(4H)oxazolone Derivatives:  
Oxazolone Ring Transformation Leading to Other Heterocyclic Structures*”, J. Het.  
21           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  
23           structure*”, Int. J. Peptide Protein Res. 45, 1995, 266-271; Mita, R. și colab., „*Process  
for producing N-acylphenylalanines*”, US 4612388, 1986].

25           Mai mult, nucleul oxazolic este prezent în structura unor compuși folosiți ca substanțe  
active în compoziția unor medicamente, printre care: oxaprozolul cu acțiune antiinflamatoare,  
27           mubritinibul cu acțiune antineoplazică, sulfamoxolul cu acțiune antibacteriană, aleglitazarul  
utilizat ca antidiabetic etc. [Kakkar S., Narasimhan B., „*A comprehensive review on  
29           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  
31           J. Org. Chem., 2018, 14, 506-514].

33           În ultimii ani, unii compuși din clasa oxazol-5(4H)-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 bioimagică [Bósze, S. și  
35           colab., „*Synthesis and Spectroscopic Properties of 4-Ethoxymethylene-2-(1)-naphthyl-  
5(4H)-oxazolone Labeled Fluorescent Peptides*”, Biopolymers, 2006, 81, 81-91;  
37           Rodrigues, C.A.B. și colab., „*Two-photon absorption properties of push-pull  
oxazolones derivatives*”, Dyes Pigm., 2012, 95, 713-722].

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

45           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  
47           oxazol-5(4H)-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 oxazolonici 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].

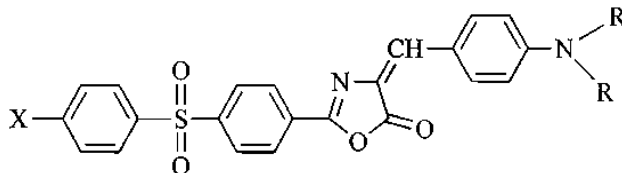
Prin urmare, ținând cont de proprietățile biologice ale compușilor din clasa oxazol-5(4H)-onelor și ale diarilsulfonelor, precum și de faptul că grupele funcționale de tip dialchilamino intensifică proprietățile fluorescente ale acestor compuși prin conjugări electronice [You Y. și colab., „Fluorophores Related to the Green Fluorescent Protein and Their Use in Optoelectronic Device”, *Adv. Mater.*, 2000, 12(22), 1678-1681], ne-am

# RO 134761 B1

1 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  
3 marcarea celulelor tumorale.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în îmbunătățirea fluorescenței  
5 marcatorelor tumorali din clasa oxazolinelor concomitent cu reducerea citotoxicității.

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



13 înlătură dezavantajele stadiului tehnicii prin aceea că R este metil sau etil și X este H, Cl sau  
15 Br.

Într-o variantă preferată, derivații de 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă  
17 care conțin un fragment arilsulfonilfenil în poziția 2, pot fi selectați din grupul constând din:

2-4-(4-(fenilsulfonil)fenil)-4-(4-(dimetilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă.

2-4-(4-(4-clorofenilsulfonil)fenil)-4-(4-(dimetilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă.

2-4-(4-(4-bromofenilsulfonil)fenil)-4-(4-(dimetilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă.

4-(4-(dietilamino)benziliden)-2-(4-(fenilsulfonil)fenil)oxazol-5(4H)-onă.

2-(4-(4-clorofenilsulfonil)fenil)-4-(4-(dietilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă.

2-(4-(4-bromofenilsulfonil)fenil)-4-(4-(dietilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă.

Derivații de 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă, care conțin un fragment  
25 arilsulfonilfenil în poziția 2, cu formula generală I, conform invenției, necitotoxici, pot fi utilizați  
ca marcatori celulari fluorescenți, pentru celule normale și tumorale.

Elementele de originalitate constau în:

1) sinteza și caracterizarea fizico-chimică a unor noi compuși cu citotoxicitate scăzută  
29 din clasa oxazol-5(4H)-onelor;

2) demonstrarea capacității compușilor de a marca fluorescent celulele de  
31 *Saccharomyces cerevisiae*, fără a le împiedica dezvoltarea;

3) demonstrarea capacității compușilor de a marca fluorescent celule umane normale  
33 (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  
35 de glioblastom din linia U-87MG).

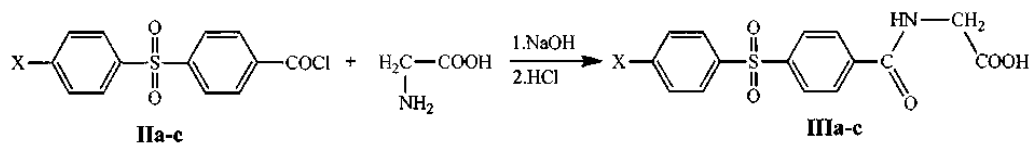
Compușii sunt obținuți printr-o metodă de sinteză care asigură un grad înalt de  
37 puritate și reproductibilitate sintetică în condiții de laborator, au fluorescență pozitivă  
semnificativă la incubarea cu celule de *Saccharomyces cerevisiae* sau cu celule umane  
39 CRL9855, HT-29, HCT116 și U-87MG, 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  
41 *in vitro* a compușilor oxazolici și structura chimică a acestora, prin studii de interacție cu  
celule non-umane (*S. cerevisiae*), dar și cu celule umane normale și canceroase  
43 standardizate.

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

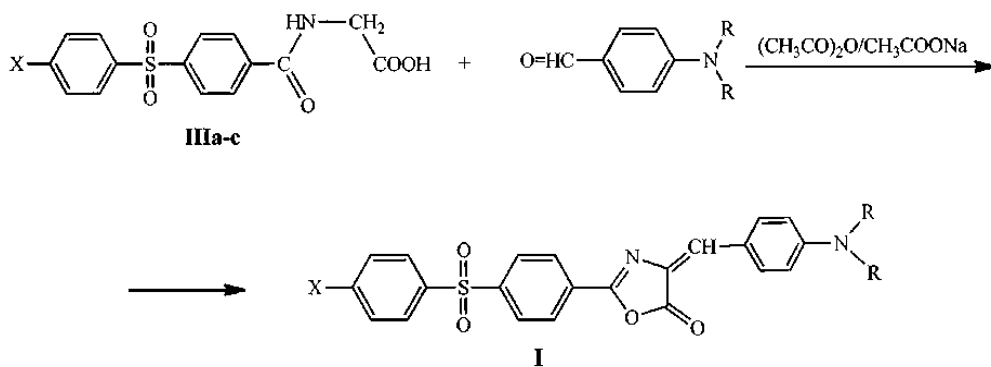
a) prepararea acizilor 2-(4-(4-X-fenilsulfonil)benzamido)acetici, unde X = H, Cl sau  
47 Br, care au fost obținuți conform datelor din literatura de specialitate [Schiketanz I. și  
49 colab., "Aminoketone, oxazole and thiazole synthesis. Part 15.<sup>1</sup> 2-[4-(4-

*Halobenzenesulphonyl)-phenyl]-5-aryloxazoles"*, ARKIVOC, (ii), 2002, 64-72] [Schiketanz I. și colab., „*Aminoketone, oxazole and thiazole synthesis. Part. 16.<sup>1</sup> Novel 5-aryl-2-(para-benzenesulfonylphenyl)oxazoles"*, Rev. Rom. 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(4H)-one prin metoda Erlenmeyer care constă în condensarea și ciclizarea simultană a unui  $\alpha$ -aminoacid N-acilat cu o aldehydă aromatică substituită [Roșca E. și colab., „*Synthesis, Characterization and Cytotoxicity Evaluation of New Compounds from oxazol-5(4H)-ones and 1,2,4-triazin-6(5H)-ones"*, Rev. Chim. (Bucharest), 2019, 70(11), 3769-3774; Roșca E. și colab., „*In silico and experimental studies for the development of novel oxazol-5(4H)-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 h, în mediu de anhidridă acetică și în prezență de acetat de sodiu anhidru (schema 2).



**I.1a:** X=H, R=CH<sub>3</sub>; **I.1b:** X=Cl, R=CH<sub>3</sub>; **I.1c:** X=Br, R=CH<sub>3</sub>  
**I.2a:** X=H, R=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; **I.2b:** X=Cl, R=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; **I.2c:** X=Br, R=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

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(4H)-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(4H)-one*

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

# RO 134761 B1

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

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

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

9            Spectrele de rezonanță magnetică de proton  $^1\text{H}$ -RMN au fost înregistrate în cloroform  
deuterat ( $\text{CDCl}_3$ ) cu un spectrometru Varian Gemini 300BB, la 300 MHz. Deplasările chimice  
11           sunt redată în părți per milion (ppm), raportarea făcându-se la standardul intern tetra-  
metilsilan (TMS), iar constantele de cuplare  $J$  sunt redată în herți (Hz). Multiplicitățile sunt  
13           abreviate astfel: s (singlet), d (dublet), t (triplet), q (quartet); l (larg).

             Spectrele de masă (MS) ale compușilor **I.2a-c** au fost înregistrate cu un spectrometru  
15           de masă triplu cuadrupol 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  $\mu\text{L}$  din  
17           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  
19           interfața ESI cu o pompă Prostar 240 SDM printr-o valvă de injectare manuală Rheodyne  
7725. Debitul de infuzare a fost de 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ , gazul de uscare a avut presiunea de 21 psi  
21           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.  
23           Fragmente 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  
25           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  
27           dimetilsulfoxid (DMSO) ale noilor compuși la concentrația  $\approx 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ .

             Descrierea pe scurt a desenelor:

29           - fig. 1 prezintă spectrele de fluorescență în domeniul 550-700 nm pentru compușii  
**I.1a-c** și **I.2a-c**;

31           - fig. 2 prezintă imagini obținute prin microscopie de fluorescență a celulelor de *S.*  
*cerevisiae* co-marcate cu DAPI și compusul **I.1c**;

33           - 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  
35           fluorescență FL2-oranj);

             - fig. 4 prezintă fluorescența celulelor tumorale umane din linia HCT116 (carcinom  
37           colorectal) și U-87MG (glioblastom) incubate 24 h cu compușii **I.1a-c** și **I.2a-c** la concentrația  
de 20  $\mu\text{M}$  evaluată prin citometrie în flux (excitare la 488 nm și emisie în canalul de  
39           fluorescență FL2-oranj), rezultatele fiind prezentate ca procent de celule fluorescente (a) și  
ca intensitate medie de fluorescență (b);

41           - fig. 5 prezintă analiza comparativă a fluorescenței celulelor tumorale umane din  
liniile HT-29 (adenocarcinom colorectal), HCT116 (carcinom colorectal) și U-87MG  
43           (glioblastom), incubate 24 h cu compușii **I.2b** și **I.2c** la concentrația de 20  $\mu\text{M}$  prin citometrie  
în flux (excitare la 488 nm și emisie în canalul de fluorescență FL2-oranj), rezultatele fiind  
45           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  $\mu\text{M}$   
47           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  
49           prezentate ca medie  $\pm$  SEM pentru triplicat de probă;

# RO 134761 B1

- 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 ± 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:  $C_{24}H_{20}N_2O_4S$

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 ( $M_r = 319,33$ ), 1,49 g (10 mmoli) 4-(dimetilamino)benzaldehida ( $M_r = 149,19$ ), 0,82 g (10 mmoli) acetat de sodiu ( $M_r = 82,03$ ) și 18,9 mL (20,42 g; 200 mmoli) anhidridă acetică ( $M_r = 102,09$ ;  $d_4^{20} = 1,082$ ).

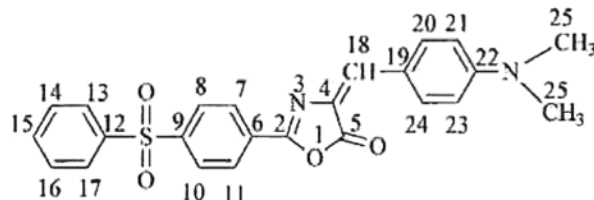
Inițial se formează o soluție care trece după câteva minute într-un precipitat consistent de culoare violet. Amestecul de reacție se refluxează timp de 4 h. După răcire se adaugă alcool etilic rece, apoi amestecul se lasă la rece timp de 12 h, după care se filtrează. Precipitatul rezultat se spală alternativ 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 ( $M_r = 432,49$ ) (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,  $v\text{ cm}^{-1}$ ): 3086s, 3065s, 3027s, 2911s, 2861s, 1784i, 1763fi, 1644i, 1604fi, 1591i, 1571fi, 1527fi, 1371i, 1323i, 1295i, 1159fi, 1105m, 1070m, 848m.

Analiza  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  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  $[M+H-CO_2]^+$ , 245  $[C_6H_5SO_2C_6H_4CO]^+$ , 134  $[C_7H_5N(CH_3)_2+H]^+$ , 121  $[C_6H_4N(CH_3)_2+H]^+$ .

Analiza UV-VIZ ( $\lambda_{max}$ , 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)benzaldehidă ( $M_r = 149,19$ ), 0,82 g (10 mmoli) acetat de sodiu ( $M_r = 82,03$ ) și 18,9 mL (20,42 g; 200 mmoli) anhidridă acetică ( $M_r = 102,09$ ;  $d_4^{20} = 1,082$ ).

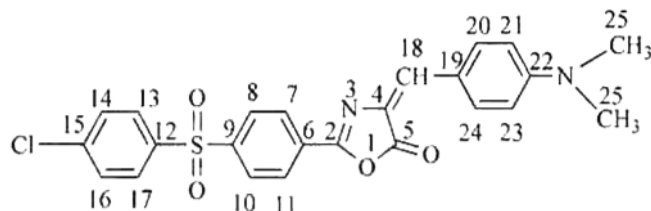
# RO 134761 B1

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

*Dovedirea structurii noului compus conform invenției*

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

7 Analiza  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  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-  
9 16), 7,26 (s, 1H, H-18), 6,82 (d, 8,2, 2H, H-21, H-23), 3,14 (s, 6H, H-25).



17 Analiza APCI-MS ( $m/z$ ): 467 [ $^{35}\text{Cl}$  M+H] $^+$ , 469 [ $^{37}\text{Cl}$  M+H] $^+$ , 439 [ $^{35}\text{Cl}$  M+H-CO] $^+$ , 441  
[ $^{37}\text{Cl}$  M+H-CO] $^+$ , 423 [ $^{35}\text{Cl}$  M+H-CO $_2$ ] $^+$ , 425 [ $^{37}\text{Cl}$  M+H-CO $_2$ ] $^+$ , 279 [ $^{35}\text{Cl}$  C $_6$ H $_4$ SO $_2$ C $_6$ H $_4$ CO] $^+$ , 281  
19 [ $^{37}\text{Cl}$  C $_6$ H $_4$ SO $_2$ C $_6$ H $_4$ CO] $^+$ , 188 [M+H- $^{35}\text{Cl}$  C $_6$ H $_4$ SO $_2$ C $_6$ H $_4$ CO] $^+$ , 190 [M+H- $^{37}\text{Cl}$  C $_6$ H $_4$ SO $_2$ C $_6$ H $_4$ CO] $^+$ .

Analiza UV-VIZ ( $\lambda_{\text{max}}$ , nm): 331; 506.

21 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.

### 23 Exemplul 3

25 *Sinteza 2-(4-(4-bromofenilsulfonyl)fenil)-4-(4-(dimetilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-  
onei (1.1c)*

Formula moleculară: C $_{24}$ H $_{19}$ BrN $_2$ O $_4$ S

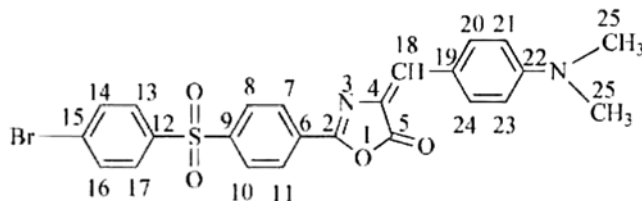
27 Compusul se prepară prin procedeul descris în exemplul 1 fiind necesari următorii  
reactanți: 3,98 g (10 mmoli) acid 2-(4-(4-bromofenilsulfonyl)benzamido)acetic (Mr = 398,23),  
29 1,49 g (10 mmoli) 4-(dimetilamino)benzaldehydă (Mr = 149,19), 0,82 g (10 mmoli) acetat de  
sodiu (Mr = 82,03) și 18,9 mL (20,42 g; 200 mmoli) anhidridă acetică (Mr = 102,09;  $d_4^{20}$  =  
31 1,082).

33 Rezultă 2,05 g compus (Mr = 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*

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

39 Analiza  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  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-  
41 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).



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



# RO 134761 B1

Analiza UV-VIZ ( $\lambda_{\max}$ , nm): 331; 506. 1  
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. 3

## Exemplul 4

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

Formula moleculară:  $C_{26}H_{24}N_2O_4S$

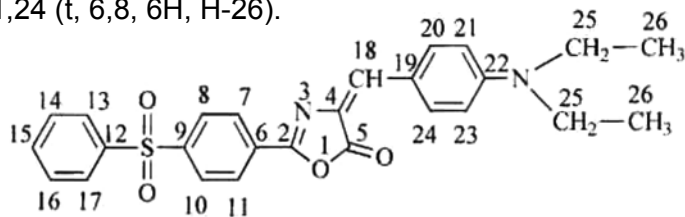
Compusul se prepară prin procedeul descris în exemplul 1 fiind necesari următorii 7  
reactanți: 3,19 g (10 mmoli) acid 2-(4-(fenilsulfonil)benzamido)acetic (Mr = 319,33), 1,77 g  
(10 mmoli) 4-(dietilamino)benzaldehydă (Mr = 177,24), 0,82 g (10 mmoli) acetat de sodiu (Mr 9  
= 82,03) și 18,9 mL (20,42 g; 200 mmoli) anhidridă acetică (Mr = 102,09;  $d_4^{20} = 1,082$ ).

Rezultă 1,52 g compus (Mr = 460,54) (randament 33%), sub forma unei pulberi violet, 11  
cu T.t. 264-265°C, solubil la rece în dimetilsulfoxid, cloroform, dimetilformamidă și acetonă,  
insolubil în apă și etanol la rece. 13

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

Analiza FT-IR (KBr,  $v\text{ cm}^{-1}$ ): 3062m, 2969m, 2926m, 2873s, 1786i, 1758fi, 1639fi, 15  
1592fi, 1521fi, 1327fi, 1295fi, 1274fi, 1157fi, 1082i, 845i.

Analiza  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 8,21 (d, 8,1, 2H, H-7, H-11), 8,10 (m, 2H, H- 17  
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, 19  
6,8, 4H, H-25), 1,24 (t, 6,8, 6H, H-26).



Analiza ESI-MS (m/z): 461  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 433  $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_2\text{H}_4]^+$ , 245  $[\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}]^+$ , 188  
 $[\text{NHCCHC}_6\text{H}_4\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2]^+$ . 27

Analiza UV-VIZ ( $\lambda_{\max}$ , nm): 333; 514. 29

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. 31

## Exemplul 5

Sinteza 2-(4-(4-clorofenilsulfonil)fenil)-4-(4-(dietilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onei  
(I.2b) 33

Formula moleculară:  $C_{26}H_{23}ClN_2O_4S$  35

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), 37  
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;  $d_4^{20}$   
= 1,082). 39

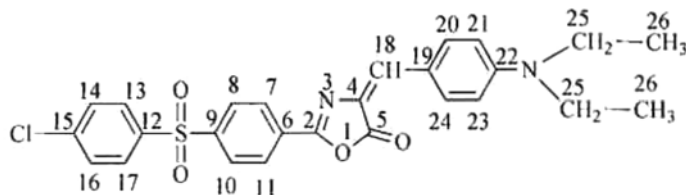
Rezultă 1,63 g compus (Mr = 494,99) (randament 33%), sub forma unei pulberi roșie- 41  
portocalie, cu T.t. 233-235°C, solubil la rece în dimetilsulfoxid, cloroform, dimetilformamidă  
și acetonă, insolubil în apă și etanol la rece. 43

Dovedirea structurii noului compus conform invenției

Analiza FT-IR (KBr,  $v\text{ cm}^{-1}$ ): 3082s, 3040s, 2973m, 2934s, 2898s, 2875s, 1789i, 1771  
fi, 1642i, 1605fi, 1575fi, 1522fi, 1323i, 1272i, 1156fi, 1082i, 847m, 767i. 45

# RO 134761 B1

1 Analiza  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  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,  
3 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,  
5 6H, H-26).



11 Analiza ESI-MS ( $m/z$ ): 495 [ $^{35}\text{Cl}$  M+H] $^+$ , 497 [ $^{37}\text{Cl}$  M+H] $^+$ , 467 [ $^{35}\text{Cl}$  M+H-CO] $^+$ , 469  
12 [ $^{37}\text{Cl}$  M+H-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  
13 [ $\text{NHCCHC}_6\text{H}_4\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ ] $^+$ .

14 Analiza UV-VIZ ( $\lambda_{\text{max}}$ , nm): 336; 515.

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

## 17 Exemplul 6

18 *Sinteza 2-(4-(4-bromofenilsulfonil)fenil)-4-(4-(dietilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onei*  
19 **(1.2c)**

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

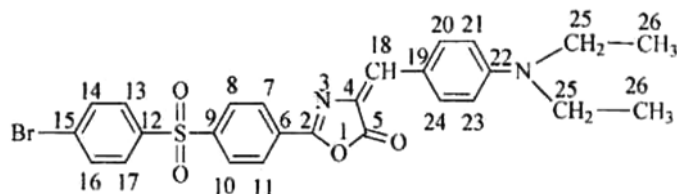
21 Compusul se prepară prin procedeul descris în exemplul 1 fiind necesari următorii  
22 reactanți: 3,98 g (10 mmoli) acid 2-(4-(4-bromofenilsulfonil)benzamido)acetic ( $M_r = 398,23$ ),  
23 1,77 g (10 mmoli) 4-(dietilamino)benzaldehydă ( $M_r = 177,24$ ), 0,82 g (10 mmoli) acetat de  
24 sodiu ( $M_r = 82,03$ ) și 18,9 mL (20,42 g; 200 mmoli) anhidridă acetică ( $M_r = 102,09$ ;  $d_4^{20} =$   
25 1,082).

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

29 *Dovedirea structurii noului compus conform invenției*

30 Analiza FT-IR (KBr,  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ ): 3081m, 3063s, 3039s, 2972m, 2933m, 2896s, 2874s,  
31 1789fi, 1770fi, 1643fi, 1605fi, 1575fi, 1521fi, 1322fi, 1272fi, 1156fi, 1081m, 848m, 625i, 569i.

32 Analiza  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm,  $J$  Hz): 8,23 (d, 8,4, 2H, H-7, H-11), 8,10 (m, 2H, H-  
33 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,  
34 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,  
35 6H, H-26).



41 Analiza ESI-MS ( $m/z$ ): 539 [ $^{79}\text{Br}$  M+H] $^+$ , 541 [ $^{81}\text{Br}$  M+H] $^+$ , 511 [ $^{79}\text{Br}$  M+H-C $_2\text{H}_4$ ] $^+$ , 513  
42 [ $^{81}\text{Br}$  M+H-C $_2\text{H}_4$ ] $^+$ , 188 [ $\text{NHCCHC}_6\text{H}_4\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ ] $^+$ .

43 Analiza UV-VIZ ( $\lambda_{\text{max}}$ , nm): 335; 516.

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

# RO 134761 B1

<i>Spectroscopia de fluorescență a 4-(4-(dialchilamino)benziliden)-2-(4-(4-X-fenilsulfonil)fenil)oxazol-5(4H)-onelor</i>	1
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.	3 5
Spectrele de emisie au fost înregistrate cu un cititor de plăci multimodal Thermo Scientific Varioskan Flash, utilizând incremente de 5 nm pentru toate determinările.	7
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.	9
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.	11
Spectrele de fluorescență în domeniul 550-700 nm pentru compușii I.1a-c și I.2a-c sunt prezentate în fig. 1.	13
<i>Evaluarea tolerabilității drojdiei Saccharomyces cerevisiae la incubarea cu noii compuși</i>	15
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 <i>S. cerevisiae</i> în contact cu soluții ale acestor compuși de diferite concentrații în DMSO. S-a ales ca solvent DMSO întrucât acesta este biocompatibil cu celulele.	17 19 21
<i>Metodologie</i>	
<i>Tulpini fungice și condiții de creștere</i>	23
Tulpina de <i>S. cerevisiae</i> utilizată în cadrul acestui studiu a fost BY4741 (MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15A0; 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, <i>Methods enzymology</i> ”, 350, 2002, 3-41].	25 27
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 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 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.	29 31 33
<i>Evaluarea creșterii celulelor de S. cerevisiae</i>	
Pre-culturi crescute peste noapte în YPD au fost inoculate în mediu SC la densitatea 2 x 10 <sup>5</sup> celule/mL. Ulterior, celulele au fost incubate 2 h 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” în 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 marorul reprezentat de celulele crescute în prezența DMSO, fără compus.	35 37 39 41 43
Rezultatele obținute în cazul compușilor I.1a-c:	45
- la concentrația de 0,1 mM, creșterea culturii de <i>S. cerevisiae</i> raportată la control a fost următoarea: I.1a - 88,3%; I.1b - 94,9%; I.1c - 79,3%;	47

# RO 134761 B1

1 - 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%.

3 Rezultatele obținute în cazul compușilor **I.2a-c**:  
- la concentrația de 0,1 mM, creșterea culturii de *S. cerevisiae* raportată la control a  
5 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  
7 următoarea: **I.2a** - 72,5%; **I.2b** - 87,4%; **I.2c** - 83,1%.

9 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.

11 *Localizarea la nivel celular a noilor compuși în celulele de Saccharomyces cerevisiae*  
Ținând cont de toxicitatea redusă a compușilor asupra celulelor de *S. cerevisiae*  
13 precum și de proprietățile lor fluorescente, s-a testat posibilitatea acestora de a fi utilizați ca  
marcatori celulari fluorescenți.

## 15 *Metodologie*

În acest scop, celulele de *S. cerevisiae* au fost inoculate dintr-o pre-cultură în mediu  
17 SD lichid și crescute sub agitare (200 rpm, 30°C) până la  $5 \times 10^6$  celule/mL (faza timpurie de  
creștere exponențială) după care au fost adăugați compușii la concentrația finală 50 μM din  
19 soluții stoc în DMSO (10 mM). Celulele au fost co-marcate cu colorantul 4',6-diamidino-2-  
fenilindol (DAPI-0,01 μg/mL) pentru vizualizarea nucleului și a mitocondriilor. Celulele au fost  
21 incubate cu compușii testați încă 2 h înainte de a fi vizualizate cu un microscop de  
fluorescență Olympus (Olympus BX53, Japan) echipat cu lampă de mercur HBO-100 și  
23 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  
25 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  
27 compușilor este minimă).

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

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

33 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  
35 (fig. 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.

37 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.

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

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

43 Se poate concluziona că noile oxazol-5(4H)-one sintetizate nu sunt toxice pentru  
*S. cerevisiae*.

45 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**  
47 difuzează și în nucleu.

# RO 134761 B1

<i>Studiul încorporării noilor compuși în celule umane normale și tumorale</i>	1
Studiul <i>in vitro</i> 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™).	3 5
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., „ <i>Proliferation of the Human Colon Carcinoma Cell Line HT-29: Autocrine Growth and Deregulated Expression of the c-myc Oncogene</i> ”, <i>Cancer Res.</i> , 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., „ <i>Knockout of MARCH2 inhibits the growth of HCT116 colon cancer cells by inducing endoplasmic reticulum stress</i> ”, <i>Cell Death Dis.</i> , 2017, e2957]. Spre deosebire de linia HCT116, linia HT-29 este mai puțin agresivă, având o dezvoltare mai lentă.	7 9 11 13 15 17
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., „ <i>Survival Analysis of Glioblastoma Multiforme</i> ”, <i>Asian Pac. J. Cancer. Prev.</i> , 2018, 19(9), 2613-2617].	19 21
<i>Metodologie</i>	23
Celulele au fost menținute în cultură conform indicațiilor furnizorului (American Tissue and Cell Colection, 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).	25 27 29 31
Datorită proprietăților fluorescente ale compușilor testați, încorporarea acestora în celule s-a putut determina prin citometrie în flux, ca fluorescență medie intracelulară.	33
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 <i>in vitro</i> este justificată de faptul că noii compuși prezintă o solubilitate bună în acest solvent biocompatibil la diluții < 1/500 în mediu de cultură.	35 37 39
Celulele tumorale au fost cultivate în plăci de cultură de 24 godeuri, pornind de la 5x10 <sup>4</sup> celule/godeu, și au fost lăsate 24 h 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 0,5x10 <sup>6</sup> 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).	41 43 45 47

# RO 134761 B1

1 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  
3 în flux.

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

7 Fluorescența intracelulară datorată încorporării compușilor testați s-a măsurat prin  
citometrie în flux cu citometrul FACSCanto (Becton Dickinson), utilizând excitarea cu laserul  
9 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 minimum 10000 de  
11 evenimente.

## 13 *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 μM,  
15 în monocite umane CRL9855, în raport cu un control care a conținut celule netratate cu  
oxazolone.

17 În fig. 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 fluores-  
19 scență FL2). Rezultatele sunt prezentate ca procent de celule cu fluorescență pozitivă (mai  
mare decât autofluorescența celulelor netratate cu oxazolone).

21 Din datele experimentale prezentate în fig. 3 se observă că oxazolonele **I.2b** și **I.2c**  
sunt încorporate de majoritatea celulelor monocitare, 80-90% dintre celule prezentând  
23 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  
25 prezentat cea mai mică eficiență de încorporare, ceea ce indică faptul că derivații  
nesubstituiți cu halogeni pe nucleul arilsulfonilfenil nu se încorporează eficient în monocitele  
27 umane proliferative.

## 29 *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  
31 substanțelor sintetizate, la concentrația 20 μM, în celule tumorale aderente din liniile HT-29,  
HCT116 și U-87MG.

33 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.

35 În fig. 4 se prezintă fluorescența celulelor tumorale umane din linia HCT116  
(carcinom colorectal) și U-87MG (glioblastom) incubate 24 h cu oxazolonele testate la  
37 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  
39 ca procent de celule fluorescente (a) și ca intensitate medie de fluorescență (b).

Conform datelor din fig. 4, aproape toate celulele HCT116 care au fost incubate cu  
41 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  
43 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.

45 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  
47 HCT116. Se remarcă faptul că un procent de aproximativ 80% din celulele U-87MG incubate

# RO 134761 B1

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 (fig. 3).

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

Analizând intensitatea medie de fluorescență/celulă în cazul celulelor tumorale (fig. 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 (fig. 4) decât în celulele monocitare netumorale investigate (fig. 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 oxazolonelelor **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 fig. 5 se prezintă analiza comparativă a fluorescenței celulelor tumorale umane din liniile HT-29, HCT116 și U-87MG, incubate 24 h cu derivații **I.2b** și **I.2c** 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-oranj). Rezultatele sunt prezentate ca procent de celule fluorescente (a) și ca intensitate medie de fluorescență (b).

După cum se observă din fig. 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 oxazolonelelor **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 (fig. 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-metiliazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazoliu). Datele rezultate din testul reducerii MTS au fost coroborate cu date privind moartea celulară din punctul de vedere al integrității membranei plasmatică celulare, obținute prin testul eliberării lactat dehidrogenazei (LDH).

# RO 134761 B1

1 Celulele tumorale investigate sunt celule aderente care au fost însămânțate în plăci  
de cultură cu 96 de godeuri, cu 24 h înainte de adăugarea noilor compuși, pentru a permite  
3 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  $10^4$   
5 celule/godeu, celulele HCT116 la  $0,5 \times 10^4$  celule/godeu, iar monocitele la  $3 \times 10^4$   
celule/godeu.

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

Determinarea viabilității și multiplicării celulare s-a realizat prin testul reducerii MTS,  
11 utilizând kitul CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega  
Corporation). Testul reducerii MTS presupune înregistrarea densității optice (DO) la lungimea  
13 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  
15 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  
17 celulare se scade valoarea fondului obținută în probele aceluare care conțin mediu de cultură.

Determinarea efectului noilor oxazolone **I.2b** și **I.2c** asupra integrității membranei  
19 plasmatică s-a realizat prin testul eliberării LDH, utilizând kitul colorimetric CytoTox 96<sup>®</sup> Non-  
Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega Corporation). Sistemul măsoară cantitativ  
21 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  
23 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  $DO \pm SEM$   
25 (densitate optică medie  $\pm$  eroarea standard a mediei). Din valorile DO corespunzătoare  
probelor celulare se scade valoarea fondului (obținută în probele aceluare care conțin mediu  
27 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  
29 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].

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

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

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

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

Au fost investigate comparativ potențialele efecte citotoxice ale oxazolonei **I.2b** și  
45 **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  
47 mică măsură, în celulele HT-29 (fig. 5).



# RO 134761 B1

În fig. 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 fig. 7 arată că derivații oxazolonici **I.2b** și **I.2c** în intervalul de concentrații 5-20  $\mu$ M 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 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 oxazolonici **I.2b** și **I.2c**, la concentrația de 20  $\mu$ M, au capacitatea de a marca fluorescent unele tipuri de celule 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).

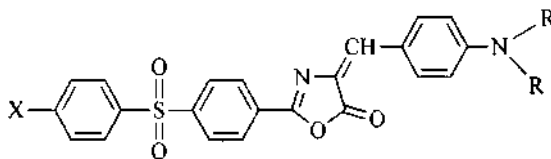
Compușii oxazolonici **I.2b** și **I.2c** nu afectează proliferarea celulelor tumorale de colon investigate, dar tind să limiteze multiplicarea celulelor netumorale proliferative de tipul monocitelor CRL9855. Potențialele efecte citostatice ale compușilor asupra celulelor normale nu ridică probleme medicale, 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.

# RO 134761 B1

## Revendicări

1. 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**, R este metil sau etil și X este H, Cl sau Br.

2. Derivat de 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă definit în revendicarea 1, selectat din grupul constând din:

2-(4-(fenilsulfonil)fenil)-4-(4-(dimetilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă.

2-(4-(4-clorofenilsulfonil)fenil)-4-(4-(dimetilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă.

2-(4-(4-bromofenilsulfonil)fenil)-4-(4-(dimetilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă.

4-(4-(dietilamino)benziliden)-2-(4-(fenilsulfonil)fenil)oxazol-5(4H)-onă.

2-(4-(4-clorofenilsulfonil)fenil)-4-(4-(dietilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă.

2-(4-(4-bromofenilsulfonil)fenil)-4-(4-(dietilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă.

3. Derivat de 4-(4-(dialchilamino)benziliden)oxazol-5(4H)-onă, care conține un fragment arilsulfonilfenil în poziția 2, cu formula generală I, definit în revendicarea 1, necitotoxic, pentru utilizare ca marcator celular fluorescent, pentru celule normale și tumorale.

(51) Int.Cl.

C07D 263/10 (2006.01);

C09K 11/06 (2006.01)

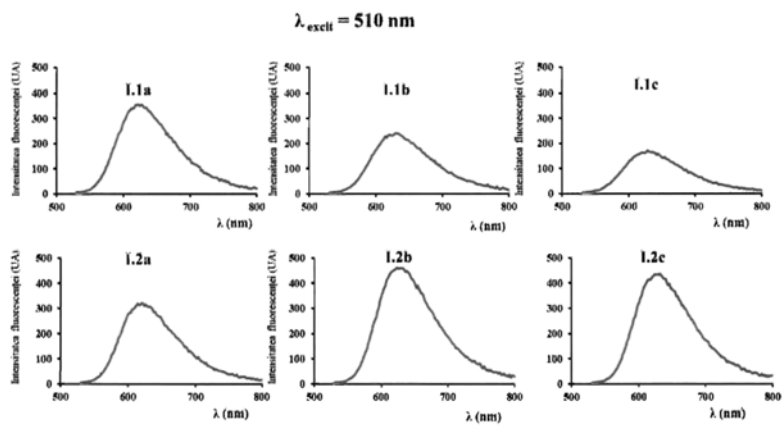


Fig. 1

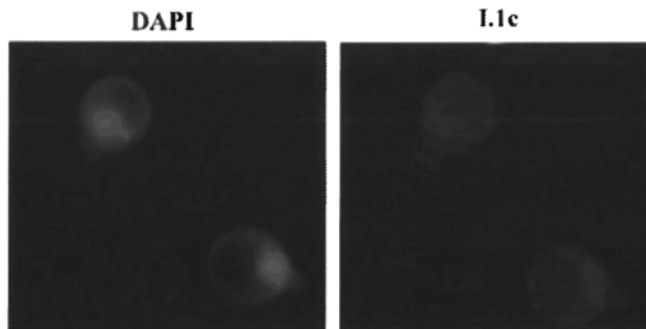


Fig. 2

(51) Int.Cl.

C07D 263/10<sup>(2006.01)</sup>,

C09K 11/06<sup>(2006.01)</sup>

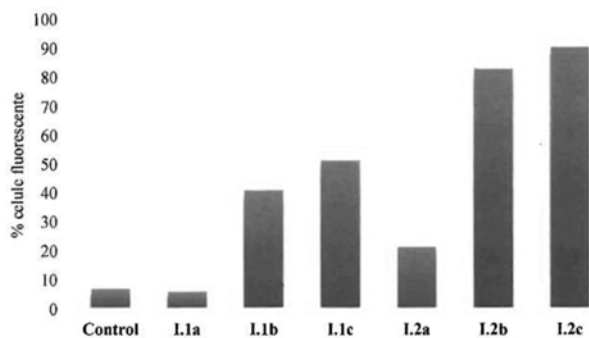


Fig. 3

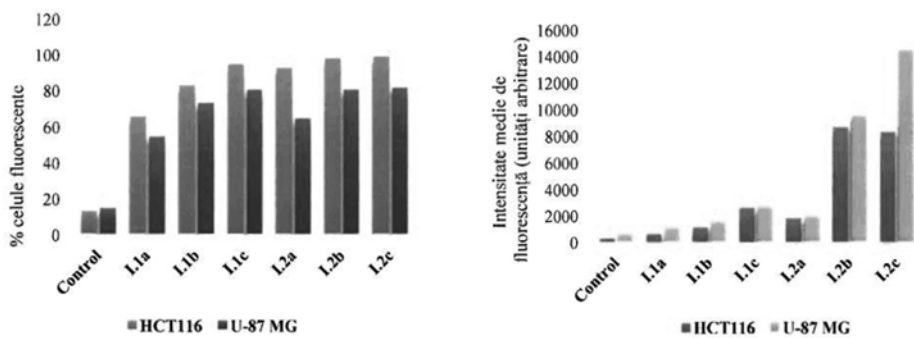


Fig. 4

(51) Int.Cl.  
**C07D 263/10** (2006.01);  
**C09K 11/06** (2006.01)

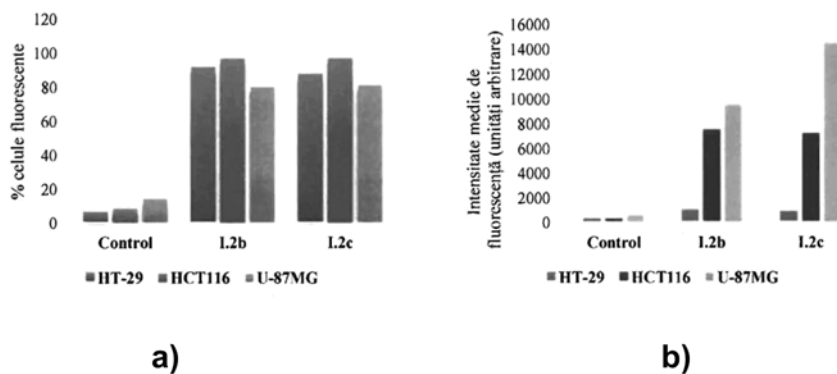


Fig. 5

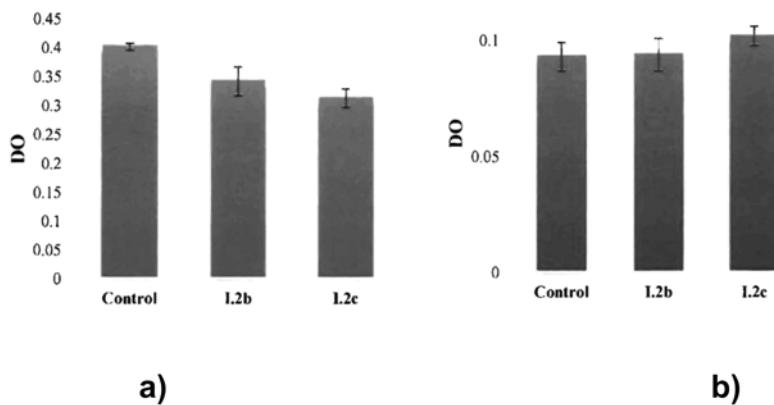


Fig. 6

(51) Int.Cl.

C07D 263/10<sup>(2006.01)</sup>,

C09K 11/06<sup>(2006.01)</sup>

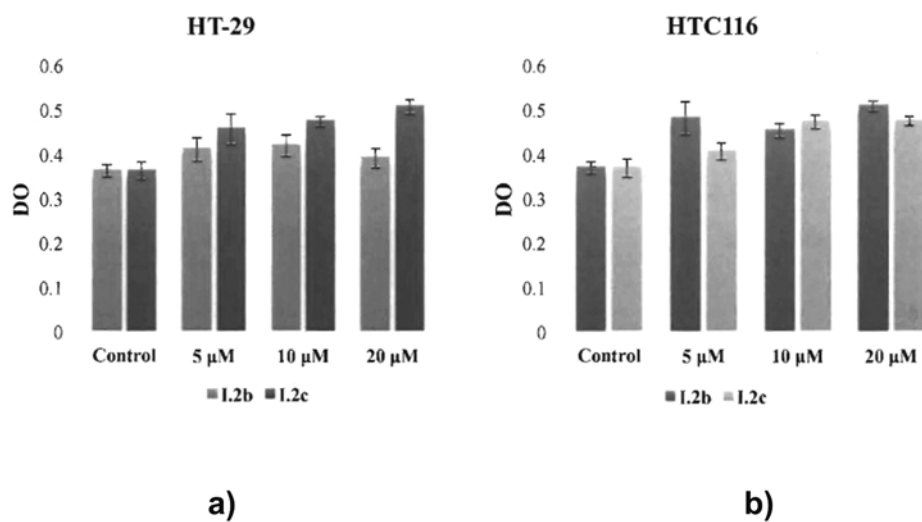


Fig. 7



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
 Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
 sub comanda nr. 543/2022