

Invenția se referă la chimie și medicină, în special la un compus cu schelet hibrid terpenic și guanidinic și poate fi utilizat pentru tratamentul cancerului.

În practica mondială designul moleculelor cu proprietăți anticancer s-a dezvoltat preponderent în direcția sintezei combinațiilor cis-platinice [1]. Utilizarea compușilor platinici în tratarea cancerului se confruntă în prezent cu multiple efecte adverse. Problema de asamblare a unor agenți noi de inhibare a proliferării celulelor canceroase, eficienți și puțin toxici rămâne în continuare una actuală.

Majoritatea preparatelor antitumorale existente nu asigură un efect curativ radical și stabil. Tratamentele existente, de regulă, nu conduc la dispariția definitivă a oricărui semn de boală, ci doar ameliorează temporar starea generală a pacienților, aceasta recidivând frecvent cu manifestări clinice mai pronunțate.

Din seria de preparate frecvent utilizate în practica medicală este bine cunoscută Cisplatina, care este un medicament chimioterapic utilizat pentru a trata un număr mare de cancere [2]. Aceasta include cancerul testicular, cancerul ovarian, cancerul de col uterin, cancerul de sân, cancerul vezicii urinare, cancerul capului și gâtului, cancerul esofagian, cancerul pulmonar, mezoteliomul, tumorile cerebrale și neuroblastomul. Se aplică prin injecție intravenoasă. Cisplatina este din familia de medicamente antineoplazice bazate pe platină. Funcționează în parte prin legarea și inhibarea replicării ADN.

Preparatul menționat însă are și un șir de dezavantaje, ce constau în:

- supresia măduvei osoase;
- problemele auditive;
- problemele de rinichi;
- amorțeală;
- tulburări de mers pe jos,
- reacții alergice;
- utilizarea în timpul sarcinii dăunează asupra dezvoltării copilului;
- probleme de electroliză și boli de inimă ș.a.

Extinderea cercetărilor științifice în domeniul elaborării remediilor anticancer cu activitate biologică ridicată, la prețuri competitive cu preparatele de import, adică accesibile pentru populație, din materie primă locală, constituie o problemă de importanță primordială pentru Republica Moldova.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în lărgirea gamei de compuși enantiopuri, cu activitate anticanceroasă ridicată obținuți prin semisinteză din materii prime de origine vegetală, ieftine și accesibile. Extinderea cercetărilor științifice în domeniul elaborării remediilor anticancer cu activitate biologică ridicată, la prețuri competitive cu preparatele de import, adică accesibile pentru populație, din materie primă locală, constituie o problemă de importanță primordială pentru Republica Moldova. O valoare adăugată invenției oferă faptul că materia primă locală este renovabilă, accesibilă și poate fi obținută din deșeurile provenite din industria uleiurilor etero-oleaginoase.

Esența invenției constă în aceea că se revendică compusul N-carbamimidoil-2-((8aS)-2,5,5, 8a-tetrametil-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidronaftalen-1-il)acetamidă pentru utilizare în calitate de compus cu activitate antiproliferativă și citotoxică.

Rezultatul invenției constă în obținerea a unui compus nou, terpeno-guanidinic, care poate fi utilizat pentru tratarea unor afecțiuni de natură canceroasă.

Avantajele compusului revendicat constau în:

1. activitatea biologică mai ridicată a N-carbamimidoil-2-((8aS)-2,5,5, 8a-tetrametil-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidronaftalen-1-il)acetamidă în raport cu preparatele cunoscute;
2. accesibilitatea compusului revendicat sub aspect eficiență/preț;
3. accesibilitatea materiei prime și originea ei locală;
4. eficiența și simplitatea metodei de sinteză a acestuia.

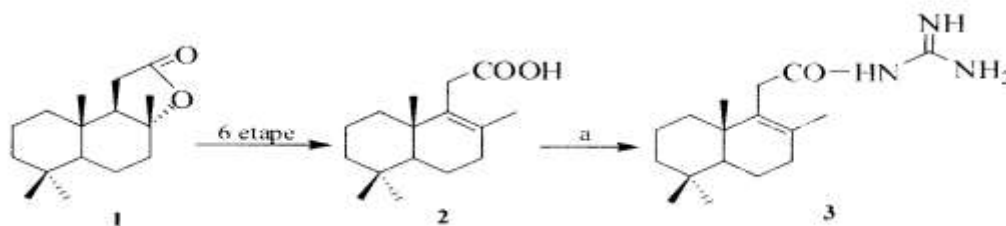
Invenția soluționează problema prin aceea că N-carbamimidoil-2-((8aS)-2,5,5, 8a-tetrametil-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidronaftalen-1-il)acetamidă ce posedă un schelet hibrid terpenic și guanidinic poate fi utilizată în calitate de compus cu proprietăți anticancer pronunțate, fapt confirmat de testările biologice ale acestuia *in vitro* utilizând teste antiproliferative și de citotoxicitate pentru liniile celulare Colo 205 sensibile la doxorubicină și liniile celulare Colo 320 de adenocarcinom colon uman, multidrog-rezistente și doxorubicină-rezistente.

De menționat, că obținerea N-carbamimidoil-2-((8aS)-2,5,5, 8a-tetrametil-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidronaftalen-1-il)acetamidă dar și rezultatele testărilor biologice ale acestui compus nu au fost descrise anterior în literatura de specialitate. Compușii care conțin guanidină pot fi sintetizați direct pornind de la acizi (Carbone M., Ciavatta M., Mathieu V., Ingels A., Pascale P., Mollo E., Ungur N., Y-W Guo, Gavagnin M. Marine terpenoiddiacylguanidines: structure, synthesis and biological evaluation of naturally occurring actinofide and synthetic analogues. *J. Nat. Prod.*, 80, 2017, p. 1339-1346). În cererea revendicată se descrie prepararea derivaților guanidinei ai acidului $\delta^{8,9}$ -biciclohomofarnesenoic (2).

Materialul de pornire pentru sinteza derivatului guanidinei (3) a fost acidul $\delta^{8,9}$ -biciclohomofarnesenoic (2), care a fost preparat din norambreinolidă (1) (șase etape, 62% randament global), conform procesului descris anterior (Aricu A. N., Kuchkova K. I., Barba A. N., Dragalin I. P., Shova S. G., Vornicu N., Gorinchoi E. K., Secara E. S., Lungu L. V., Niculaua M., Ungur N. D., Vlad P. F. Synthesis from norambreinolide, structure, and antimicrobial

activity of dihomodrimanesesquiterpenoids with azine, hydrazide, and dihydrazide fragments. Chem. Nat. Compd., 52, 2016, p. 1029-1036).

Acidul (2) se activează cu CDI, apoi se tratează cu guanidină în DMF, rezultând N-($\delta^{8,9}$ -biciclo-xomofarnesenoi)-guanidina (3) (Schema 1):



Schema 1

Calea de reacție pentru prepararea derivaților guanidini ai acidului $\delta^{8,9}$ -biciclo-xomofarnesenoi: (a) NH(Na)CN, AcOH; EtOH- H₂O (5:1), 20°C, 24 h, δ , 20 h.

Structura compusului revendicat a fost confirmată prin metode de analiză obligatorii, spectroscopie în infraroșu (IR), rezonanță magnetică nucleară mono- și bidimensională (¹H, ¹³C RMN și 2D), spectrometrie de masă (HRMS).

Compusul (3) are o activitate citotoxică puternică pe liniile celulare sensibile și rezistente la adenocarcinom de colon (IC₅₀ între 4 și 8 μ M). Interesant: compusul (3) are activitate citotoxică mai scăzută asupra celulelor fibroblaste pulmonare normale, implicând toxicitatea selectivă a compușilor. Comparând activitatea citotoxică a compusului cu cisplatina, compusul a prezentat o activitate citotoxică mai puternică, cu selectivitate față de celulele tumorale (tab.). Compusul revendicat este stabil la contact cu aerul, parțial solubil în alcoolii și apă, solubil în dimetilsulfoxid (DMSO), clorura de metilen, acetat de etil și acetonă.

Exemplu de realizare a invenției

Prepararea N-carbamimidoil-2-((8aS)-2,5,5, 8a-tetrametil-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidronaftalen-1-il)acetamidă (3). Clorhidratul de guanidină (131 mg, 1,37 mmoli) se dizolvă în 3,6 ml DMF- dioxan anhidru (1:1) și se tratează cu terț-butoxid de potasiu (160 mg, 1,43 mmoli) sub atmosferă de argon. Acest amestec se amestecă la 50°C timp de 1 oră și apoi se răcește la temperatura camerei. Separat, acidul $\delta^{8,9}$ -biciclo-xomofarnesenoi (2) (170 mg, 0,68 mmoli), dizolvat în DMF anhidru (3,5 ml) se activează prin adăugarea de CDI (132 mg, 0,81 mmol), în porțiuni la temperatura camerei. După ce se depozitează timp de o oră, acidul activat se adaugă prin picurare la soluția de guanidină și amestecul de reacție se agită 28 h la temperatura camerei. Reacția se stinge prin adăugare de apă rece (0°C, 15 mL) și apoi se extrage cu EtOAc (3x25 mL). Extractul se spală cu soluție de sare (2x8 mL), se usucă și se evaporă sub presiune redusă pentru a se obține un produs brut (180 mg), care se cromatografiează pe o coloană de silicagel (4,8 g). Se obțin (64 mg) monoacilguanidina (3).

N-carbamimidoil-2-((8aS)-2,5,5,8a-tetrametil-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidronaftalen-1-il)acetamidă (3).

(Randament 32%) sub formă de solid alb (CH₃CN), p.t. 149-151°C; [A] D₁₇ + 60,6 (c 1,73, CHCl₃); IR (KBr) v_{max} 3413, 3363, 3057, 2942, 2922, 2868, 1657, 1599, 1584, 1520, 1456, 1356, 1268, 757 cm⁻¹; RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz): 8-7,07 (4H, s lată, 2NH și NH₂), 2,92 (1H, d, J - 16,6 Hz, H-11), 2,83 (1H, d, J - (3H, s, H-13), 0,87 (6H, s, H-14,16), 0,80 (3H, s, H-15); ¹³C RMN (DMSO-d₆, 100 MHz): 8-184,1 (C - O), 162,5 (C - NH), 136,9 (C, C-9), 127,2 (C, C-8), 51,5 (CH, C 5), 41,8 (CH₂, C-3), 39,5 (CH₂, C-11), 38,5 (C, (CH₃, C-14), 33,4 (C, C-4), 21,9 (CH₃, C-15), 20,5 (CH₃, C-16), 20,2 (CH₃, C-13), 19,2 (CH₂, C- 6), 19,0 (CH₂, C-2); HRESIMS m/z (pos): 291,2383. C₁₇H₂₉N₃₀ (calculat 291,4356); Anal. Calc. pentru C₁₇H₂₉N₃₀: C, 70,06; H, 10,03; N, 14,45. Găsit: C, 69,81; H, 9,73; N, 14,18.

Testarea activității biologice ale N-carbamimidoil-2-((8aS)-2,5,5, 8a-tetrametil-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidronaftalen-1-il)acetamidă (3).

Activitatea biologică a compusului revendicat a fost testată *in vitro* aplicând teste antiproliferative și de citotoxicitate pentru liniile celulare Colo 205 sensibile la doxorubicină și liniile celulare Colo 320 de adenocarcinom de colon uman, multidrog-rezistente și doxorubicină-rezistente.

Rezultatele sunt rezumate în tab. 1. Rezistența celulelor Colo 320 este mediată în primul rând prin supraexpresia ABCB1 (glicoproteina P), membru al celulelor xenobiotice de extrudare a casetei de legare ATP (ABC). Relația dintre nivelul de expresie al proteinelor transportoare MDR, cum ar fi transportorii ABC și sensibilitatea la medicamente sau posibili candidați la medicamente, are o importanță deosebită în ceea ce privește chimioterapia clinică și experimentală și dezvoltarea de medicamente.

Activitatea antiproliferativă și citotoxică
Tabelul 1

Compusul	Efectul antiproliferativ, μM		Efectul citotoxic, μM		
	Colo 205 sensibil	Colo 320 rezistent	Colo 205 sensibil	Colo 320 rezistent	NRC5 Fibroblastom pulmonar uman
3	7,86±2,41	4,21±1,15	5,61±1,40	5,09±1,21	20,28±7,42
Cisplatina	23,2±2,95	9,74±3,11	66,77±4,62	12,17±1,01	44,12±1,28

Pentru a determina activitatea compușilor asupra proliferării celulare, a fost ales un număr scăzut de celule (6×10^3 celule/godeu) și perioada de incubare a testului MTT a fost de 72 ore. Cisplatina a fost utilizată ca un control pozitiv. Compusul (3) a exercitat o activitate antiproliferativă puternică asupra ambelor linii celulare de adenocarcinom de colon (IC₅₀ între 3 și 8 μM).

În testul citotoxicității a fost utilizat un număr mare de celule (2×10^4 celule/godeu) și inhibarea creșterii celulare a fost determinată după 24 de ore prin testul MTT pentru a investiga toxicitatea compușilor. Cisplatina a fost utilizată ca un control pozitiv, iar citotoxicitatea a fost măsurată și în celule fibroblaste pulmonare embrionare umane normale (MRC-5). Solventul DMSO nu a afectat viabilitatea celulelor. Compusul (3) are o activitate citotoxică puternică pe liniile celulare sensibile și rezistent la adenocarcinom de colon (IC₅₀ între 4 și 8 μM). Interesant: compusul (3) are activitate citotoxică mai scăzută asupra celulelor fibroblaste pulmonare normale, implicând toxicitatea selectivă a compușilor. Comparând activitatea citotoxică a compușilor cu cisplatina, compușii au prezentat o activitate citotoxică mai puternică cu selectivitate față de celulele tumorale.

Microorganismele au fost furnizate de American Type Culture Collection (ATCC), USA.

Liniile celulare de adenocarcinom colon colonic 205 (ATCC-CCL-222) și Colo 320/MDR-LRP care au supraexprimat ABCB 1 (MDR 1) -LRP (ATCC-CCL-220.1).

Celulele au fost cultivate în mediu RPMI 1640 suplimentat cu 10% ser fetal bovin inactivat termic, 2 mM L-glutamină, 1 mM Na-piruvat și 100 mM Hepes. Liniile celulare au fost incubate la 37°C, într-o atmosferă de 5% CO₂ și 95% aer.

Celulele semi-aderente de cancer de colon uman au fost detașate cu soluția Tripsin-Versene (EDTA) timp de 5 min la 37°C.

Linia de celule fibroblastice pulmonare embrionare umane MRC-5 (ATCC CCL-171) a fost achiziționată de la LGC Promochem, Teddington, UK. Linia celulară a fost cultivată în mediul minimal esențial Eagle (EMEM, conținând 4,5 g/L glucoză) suplimentat cu un amestec de aminoacizi neesențiali, o selecție de vitamine și ser fetas bovin inactivat termic de 10%. Liniile celulare au fost incubate la 37°C, într-o atmosferă de 5% CO₂ și 95% aer.

Analiza pentru efectul citotoxic

În studiul MRC-5, fibroblastele pulmonare embrionare umane necanceroase și liniile celulare de adenocarcinom colonic uman (celule Colo 205 sensibile la doxorubicină Colo 205 și celule de adenocarcinom multidrog-rezistent) au fost utilizate pentru a determina efectul compușilor asupra creșterii celulare. Efectele concentrațiilor crescute de compuși asupra creșterii celulare au fost testate pe plăci de microtitrare cu fund plat cu 96 de godeuri. Compușii au fost diluați într-un volum de 100 μL de mediu.

Celulele fibroblaste pulmonare embrionare umane aderente au fost cultivate în plăci de microtitrare cu fund plat cu 96 de godeuri, utilizând EMEM suplimentat cu 10% ser fetal bovin inactivat termic. Densitatea celulelor au fost ajustate la 2×10^4 celule în 100 μL per godeu, celulele au fost însămânțate timp de 24 ore la 37°C, 5% CO₂, apoi mediul a fost îndepărtat din plăcile care conțin celulele și diluțiile compușilor anterior pregătite într-o placă separată au fost adăugate celulelor în 200 μL. În cazul celulelor adenocarcinomului colonului, diluțiile seriale de două ori ale compușilor au fost preparate în 100 μL de RPMI 1640, orizontal. Celulele de adenocarcinom colorectal semi-aderent au fost tratate cu soluție de Tripsin-Versene 110 (EDTA). Acestea au fost ajustate la o densitate de 2×10^4 celule în 100 μL de mediu RPMI 1640 și au fost adăugate în fiecare godeu, cu excepția godeurilor de control al mediului. Volumul final al godeurilor conținând compuși și celule a fost de 200 μL. Plăcile de cultură au fost incubate la 37°C, timp de 24 ore, iar la sfârșitul perioadei de incubare s-au adăugat în fiecare godeu 20 μL soluție de MTT (bromură de tetrazoliu albastru de tiazolil, Sigma) (dintr-o soluție stoc de 5 mg/ml). După incubare la 37°C, timp de 4 ore, s-au adăugat 100 μL de soluție de dodecil sulfat de sodiu (SDS) (Sigma) (10% în HCl 0,01 M) în

fiecare godeu și plăcile au fost incubate suplimentar la 37°C pe noapte. Creșterea celulelor a fost determinată prin măsurarea densității optice (OD) la 540/630 nm cu cititor Multiscan EX ELISA (Thermo Labsystems, Cheshire, WA, SUA). Inhibarea creșterii celulare a fost determinată conform formulei:

$$IC50 = 100 - \left[\frac{OD\ proba - OD\ controlul\ mediului}{OD\ controlul\ celular - OD\ controlul\ mediului} \right] \times 100$$

Rezultatele sunt exprimate în termeni de IC50, definit ca doza inhibitorie care reduce creșterea celulelor expuse la compușii testați cu 50%.

Analiza pentru efect antiproliferativ

Metoda este similară celei descrise în testul pentru efectul citotoxic. În testul de testare a inhibării proliferării celulare s-au distribuit 6×10^3 celule de adenocarcinom de colon în 100 μ L mediu, cu excepția godeurilor de control al mediului. Plăcile de cultură au fost incubate la 37°C, timp de 72 ore și după perioada de incubare plăcile au fost colorate cu MTT conform protocolului experimental anterior descris pentru testul citotoxicității.

Rezultatul invenției este condiționat de utilizarea, pentru prima dată, a N-carbamimidoil-2-((8aS)-2,5,5, 8a-tetrametil-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidronaftalen-1-il)acetamidă (3) în calitate de compus ce posedă proprietăți antiproliferative și anticancer pronunțate.