

RECEPȚIONAT Agenția Națională pentru Cercetare și Dezvoltare _____ <u>26</u> <u>decembrie</u> 2022	AVIZAT Secția Științe Exacte și Inginerești a AȘM <u>S. Cojoc</u> <u>26</u> <u>12</u> 2022
--	--

RAPORT ȘTIINȚIFIC ANUAL 2022
privind executarea proiectului bi/multilateral
22.80013.8007.1BL

Sinteza steroizilor cu fragment azolic în ciclul D și/sau în catena
laterală în calitate de compuși de bază pentru crearea medicamentelor destinate
tratamentului cancerului de prostată

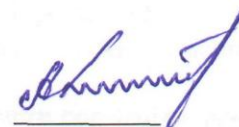
Proiecte comune de cercetare Moldova-Belarus
2022-2023
24 luni

Prioritatea Strategică

Sănătate

Directorul Institutului

dr. habilitat Aculina ARÎCU



Președintele al Consiliului științific

Conducătorul proiectului

dr. habilitat Fliur MACAEV




Chișinău 2022



1. Scopul general al proiectului conform formularului de aplicare

Obiectivul principal al acestui proiect este crearea unui nou tip de compuși steroidici, cu conținut de azot, ca bază pentru obținerea preparatelor utilizate în terapia cancerului de prostată și care cuprinde: 1) cercetarea inhibitorilor eficienți ai biosintezei androgenilor pe baza steroidilor din seria pregnanică, care conțin fragmentul azolului în inelul D și/sau în catena laterală; 2) studiul efectelor compușilor obținuți asupra creșterii celulelor tumorale în cancerul de prostată; 3) selectarea celor mai activi compuși pentru studii aprofundate, cu scopul creării, pe baza acestora, a medicamentelor pentru tratamentul cancerului de prostată.

1. Obiectivele proiectului conform formularului de aplicare

În conformitate cu scopul proiectului, în timpul realizării acestuia este planificată rezolvarea următoarelor sarcini:

- elaborarea metodelor de introducere a fragmentelor azolice (izoxazol, izoxazolidină, triazol, pirazol) în molecula steroidică (ciclul D, catena laterală) (Belarus, Moldova);
- realizarea sintezei chimice a steroidilor din seria pregnanului, conținând funcția cetonică 3β -hidroxi- Δ^5 - sau Δ^4 -3- în inelele A și B, precum și fragmentul azolic în inelul D și/sau în catena laterală (Belarus, Moldova);
- explorarea proprietăților compușilor obținuți privind reglarea apoptozei și a ciclului celular în celulele LnCap și PC3 și proprietăților inhibitoare față de CYP17A1, în scopul selectării celor mai activi compuși pentru teste biologice aprofundate, dedicate creării medicamentelor antitumorale (Belarus);
- optimizarea condițiilor de reacție și pregătirea un proiect de regulament de laborator vizând prepararea substanțelor cu proprietăți utile promițătoare, ținând cont de noutatea principală și competitivitate, care urmează să îndeplinească cerințele standardelor naționale și internaționale, și care vor fi prezentate sub formă de brevete la expoziții specializate de invenție internaționale din CSI și UE (Belarus, Moldova);
- lansarea planificată a mostrelor de laborator de substanțe noi va fi realizată cu participarea sectorului experimental-tehnologic pentru producerea hormonilor steroidi (ICB ANȘ Belarus).

2. Acțiunile planificate pentru realizarea scopului și obiectivelor proiectului

Activitatea 1.

Transformarea dehydroepiandrosteronului în precursori ai azolilor steroidici din seria androstanică.

Termenul de realizare 01.01.2022-30.06.2022.

-elaborarea metodelor de preparare a precursorilor azolilor steroidici din seria androstanică, folosind reacția de epoxidare, interacțiunea cu NaN_3 , HCl / MeOH și cuaternizarea.

Activitatea 2.

Sinteza aziridinei pe bază de (+)-carenă.

Termenul de realizare 01.07.2022-31.12.2022.

- determinarea condițiilor optime de sinteză a aziridinelor regioizomerice din seria caranului și caracterizarea structurii acestora.

3. Acțiunile realizate pentru atingerea scopului și obiectivelor proiectului

1. Ca parte a acestei etape au fost dezvoltate metode alternative, față de cele cunoscute, pentru construirea precursorilor azolilor steroidici din seria androstanică, folosind reacția de epoxidare,

interacțiunea cu NaN_3 , HCl/MeOH și cuaternizarea. Au fost acumulați în cantități suficiente opt compuși noi, derivați ai dehidroepiandrosteronului pentru studiul bioactivității.

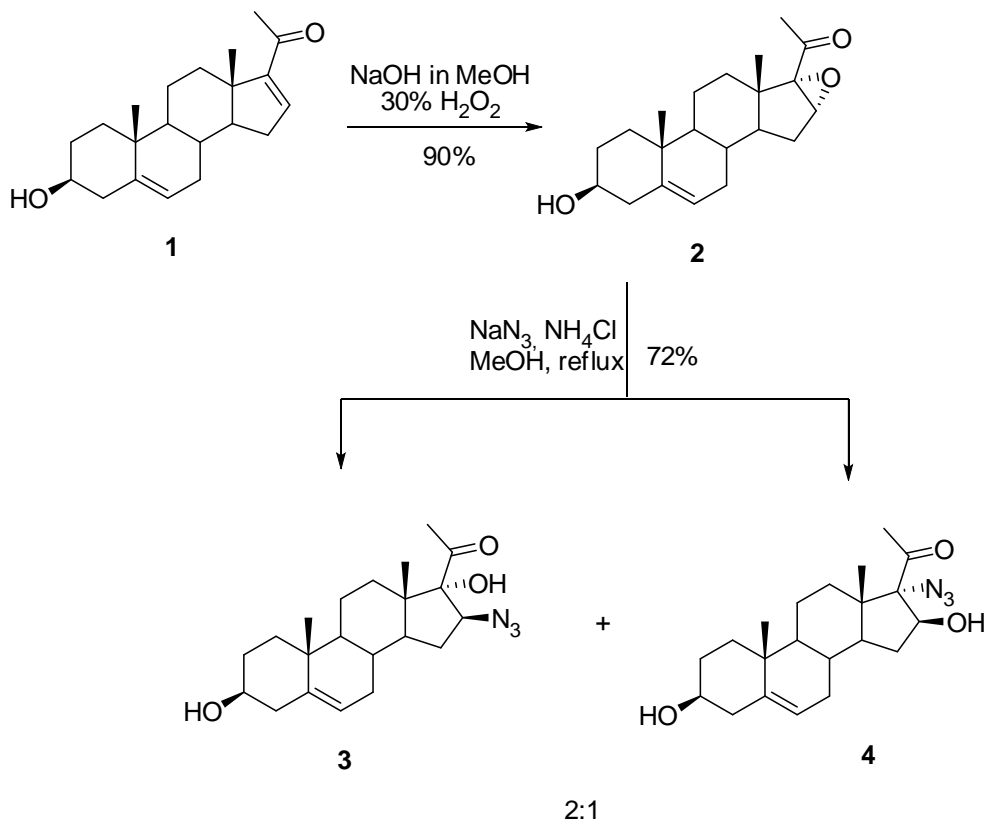
2. Au fost efectuarea cercetării căilor raționale de sinteză a noilor azoderivați ai (+)-carenei, pentru utilizarea lor în reacții de cicloadiție cu participarea precursorilor seriei androstanice.

3. Rezultatele obținute

Sinteza substanțelor noi pe baza hormonului steroid polifuncțional dehidroepiandrosteron **1** prezintă interes datorită prezenței grupărilor ceto- și hidroxil în molecula acestuia, precum și a legăturii duble carbon-carbon cu reactivitate sporită, care au, ca rezultat, efect asupra receptorilor androgeni. La modificarea acestui compus prin introducerea în molecula sa a grupărilor care conțin azot, menținând în același timp scheletul nativ, va deveni posibilă obținerea unei serii de compuși cu potențial înalt de activitate biologică. Ca rezultat, vor fi deschise perspective pentru construirea unui nou tip de sisteme heterociclice, cu studiul simultan al efectului fragmentului steroidic substituit asupra selectivității formării produselor țintă.

În cadrul etapei curente au fost selectate condițiile optime pentru funcționalizarea selectivă a dublei legături carbon-carbon a ciclului D al compusului steroidic **1**. A fost constatat, că la interacțiunea substanței **1** cu un amestec format din 30% H_2O_2 și o soluție de NaOH în MeOH a fost obținut epoxidul **2** cu un randament de 90%.

Structura și stereochimia produsului **2** a fost stabilită pe baza metodelor fizico-chimice de analiză, precum și prin analiza de difracție cu raze X.



Schema 1. Funcționalizarea derivatului steroidic **1**.

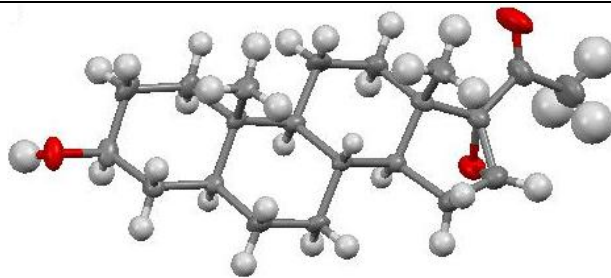


Figura 1. Structura moleculară a compusului **2**

Metodele cunoscute pentru prepararea azidelor includ deschiderea inelului epoxidic prin acțiunea NaN_3 în prezența NH_4Cl la refluxare în alcooli, sau agitarea cu NaN_3 într-o soluție apoasă de acid acetic. În aceste condiții, am reușit să izolăm două substanțe: compusul predominant **3** (randament 48%) și cel minor **4** (randament 15%). Caracteristicile spectrale, de rând cu datele de analiză elementară, au condus la concluzia despre structura substanțelor **3** și **4**, structura compusului **3** fiind confirmată și prin difracție cu raze X.

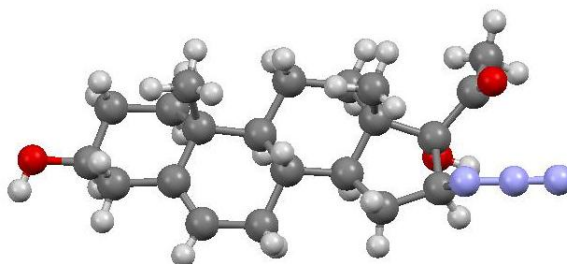
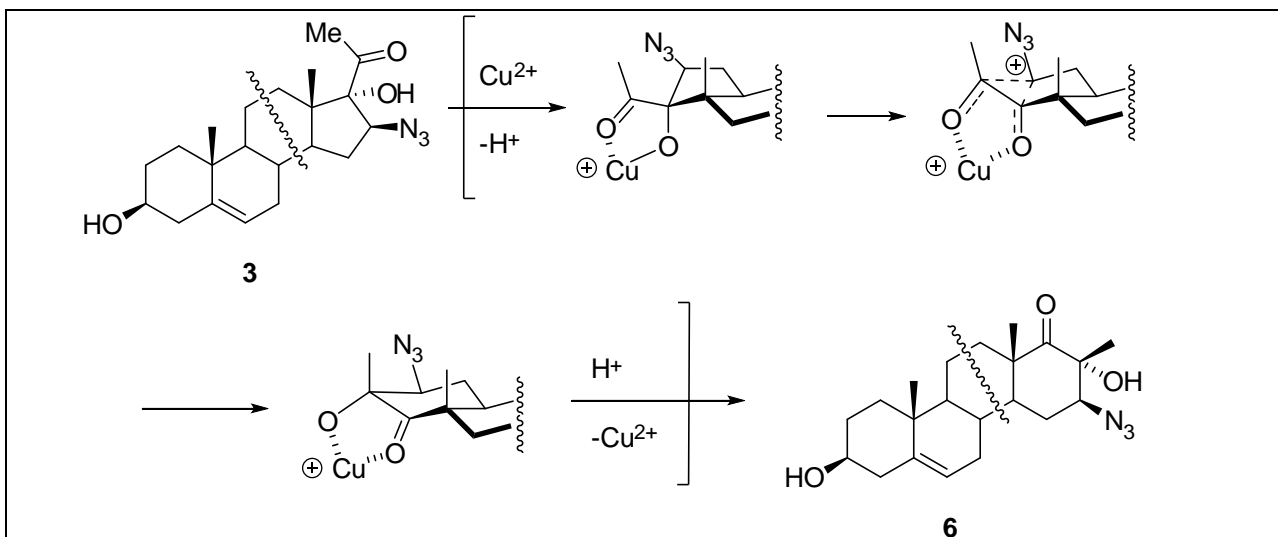


Figura 2. Structura moleculară a compusului **3**

Reacția de cicloadiție între o azidă și un alchin, în prezența unui catalizator de cupru, cu scopul formării ciclului triazolic stabil, este utilizată pe scară largă în domeniile farmaceuticii și biotehnologiei datorită parcurgerii ușoare, vitezei înalte și biocompatibilității acesteia. Funcția azidică este atractivă prin selectivitate și stabilitate sporite, în majoritatea condițiilor. Aceste proprietăți sunt deosebit de utile pentru sinteza compușilor bioactivi, atunci când este necesară îmbinarea/conjugarea proprietăților diferitor grupe funcționale farmacofore cu stabilitate limitată sau atunci când variabile precum pH-ul trebuie controlate cu atenție pentru a asigura reacții cu randament ridicat.

Cu scopul de a studia stabilitatea azidelor steroidice inițiale în condiții de condensare azidă-alchin (Click Chemistry), hidroxiazidele **3** și **4** au fost supuse reacției catalizate de Cu(I) (CuAAC). În condițiile cercetate ale reacției a fost constatată formarea unei noi substanțe, potrivit datelor CSS, în cazul hidroxiazidei **4**, care a fost izolată prin cromatografie pe coloană pe silicagel.



Schema 2. Condensarea azidă-alchin cu participarea hidroxiazidelor steroidice

Structura substanței a fost stabilită pe baza metodelor fizico-chimice de analiză, care au atestat, în comparație cu compusul **3** inițial, prezența deasemenea a grupării azidă, a două grupări hidroxil, unei legături duble C=C trisubstituite, dar nici o grupare metilcetonică. În spectrele ^{13}C RMN se conțin semnalele a trei grupări metil atașate la atomi de carbon cuaternari, iar semnalul nucleului atomului de carbon al grupării cetonice indică apropierea de atomii de carbon cuaternari, unul dintre poartă gruparea hidroxil.

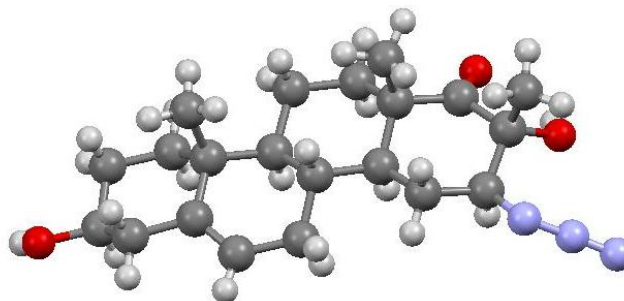
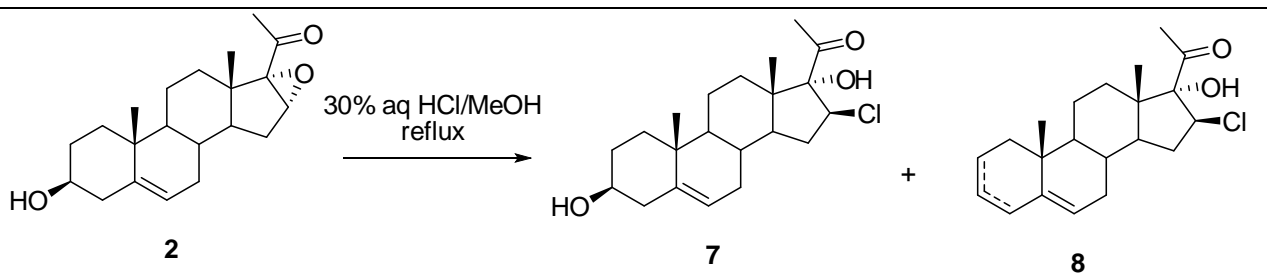


Figura 3. Structura moleculară a compusului **6**

Aceste date, combinate cu datele de analiză elementară, conduc la structura **6**, care este, de asemenea, confirmată de rezultatele analizei prin difracție cu raze X pe monocristal.

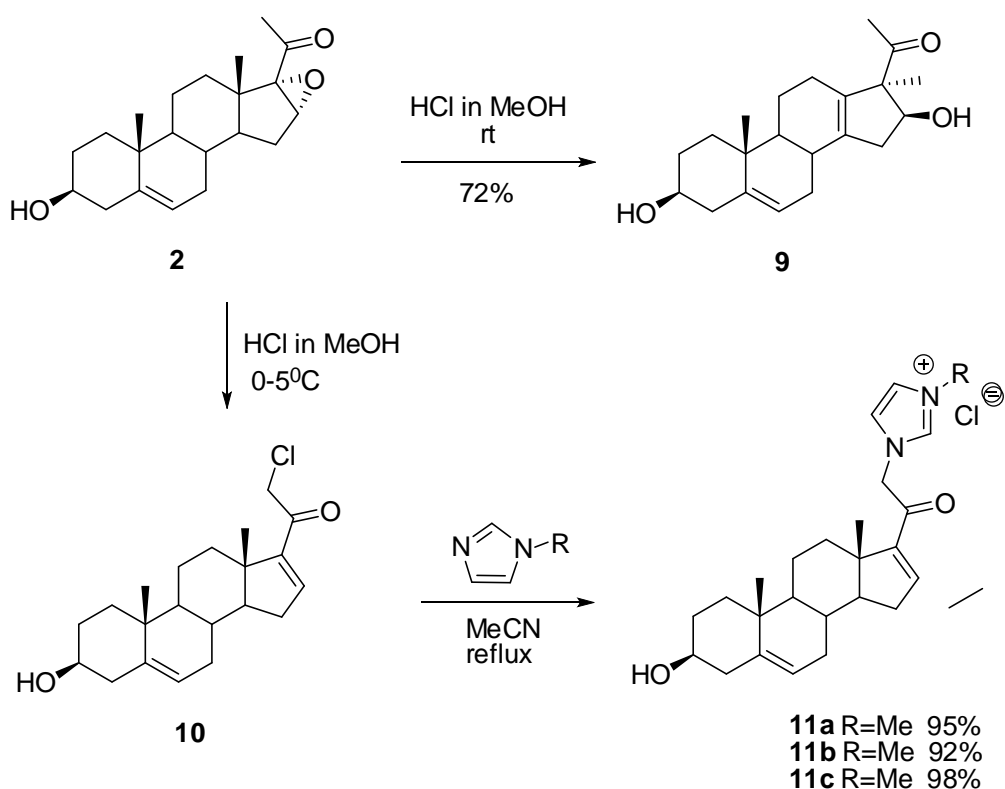
Astfel, s-a constatat că în aceste condiții, rearanjarea scheletului carbonic are loc cu formarea unui compus D-homosteroidic, conform schemei de mai jos.

O altă linie de cercetare a fost focalizată pe elucidarea posibilității de transformare a epoxicetonei **2** în derivați clorurați. S-a constatat, că refluxarea substanței **2** cu o soluție apoasă de 30% HCl produce clorhidrina **7**. A fost observat, că la un raport echimolar al reactanților, conversia completă a epoxidului nu a avut loc, prin urmare, pentru a spori gradul de transformare, în mediul de reacție s-au adăugat încă 0,5 echivalenți de reactiv în porții. Însă în acest caz, a fost semnalată o eliminare nedorită a moleculei de apă cu formarea derivatului **8**.



Schema 3. Sinteza derivaților steroidici clorurați **7** și **8**.

Următoarea etapă a cercetării noastre a fost studierea particularităților reacției de adiție a HCl gazos la compusul **2** în diferite condiții de reacție. A fost stabilit, că la utilizarea unei soluții saturate de HCl în MeOH, în produsul de reacție cu randament ridicat (72%) a fost identificat compusul **9**.



Schema 4. Studiul adiției HCl gazos la compusul **2**.

Formarea acestui compus are loc în condițiile transpoziției Wagner-Meerwein, care este însoțită de modificarea mărimii inelului carbonic inițial, cu migrarea 1,2 a grupei funcționale spre centrul carbocationic, care ia naștere în moleculă în procesul de substituție nucleofilă. Trebuie de remarcat faptul, că structura compusului **9** a fost confirmată și prin analiza de difracție cu raze X pe monocristal.

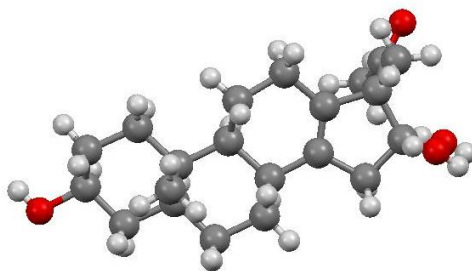


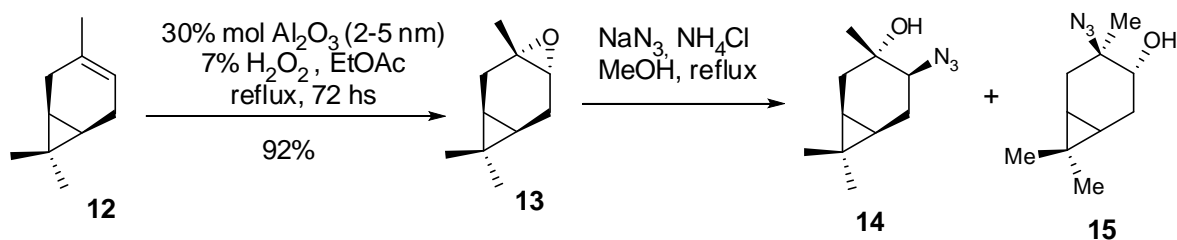
Figura 4. Structura moleculară a compusului **9**

A fost stabilit, că în rezultatul barbotării HCl gazos prin soluția metanolică a compusului **3**, răcită la $(0+5^0)$, s-a format un amestec de compus **9** și clorocetonă **10**, care au fost separate prin cromatografie pe coloană. Randamentul produsului principal **10** în acest caz a fost de 87%, iar a compusului **7**- nu a depășit 10%. Structura acestor compuși a fost demonstrată folosind experiențele RMN 1D și 2D.

Etapă finală a acestei etape de cercetare a fost studierea reacției de cuaternizare a clorocetonei **10** cu N-metilimidazol, N-etilimidazol și N-vinilimidazol, în rezultatul căreia au fost preparate sărurile corespunzătoare: **11a**, **11b** și **11c** cu randamente de 95%, 92% și 98%, respectiv.

Unul dintre derivații accesibili ai monoterpenei **12** este epoxidul **13**, care poate fi obținut prin diferite metode de oxidare. Anterior, Al_2O_3 a fost propus în calitate de catalizator eterogen pentru epoxidarea carvonei, limonenului, terpinolenei, α -terpinenei și γ -terpinenei, folosind H_2O_2 anhidru. Oxidul de aluminiu, spre deosebire de alți agenți de epoxidare folosiți pe scară largă în sinteza organică, cum ar fi, de exemplu, peracizii, nu prezintă un pericol pentru mediul ambiant.

La această etapă am demonstrat, că în rezultatul refluxării olefinei **12** într-o soluție de 7% de H_2O_2 în AcOEt, folosind α - Al_2O_3 cu dimensiunea particulelor de 2-5 nm, a fost obținut epoxidul **13**.



Schema 5. Sinteza epoxidului **13** și a azidelor izomerice **14** și **15**.

Eficiența înaltă a sistemului catalitic bazat pe utilizarea Al_2O_3 2-5 nm se datorează, probabil, numărului mare de centre acide (Al-OH_n) pe o unitate de suprafață. Grupările funcționale hidroxil Al-OH_n sporesc natura electrofilă a oxigenului peroxidic H_2O_2 cu formarea unui compus

intermediar activ, care atacă molecula de olefină pe la spate, ca urmare a efectului steric manifestat de grupa metilică la C-10 și grupele metilice geminale. O altă particularitate importantă a procesului este, că molecula de Al-OH_n poate fi un factor de stabilizare a stării de tranziție și, ca urmare, a activității sistemului catalitic. În aceste interacțiuni un rol important îl joacă legăturile de hidrogen. Merită să fie remarcat faptul, că Al-OH_n participă la formarea unui produs secundar sub formă de o moleculă de apă, ceea ce este cu siguranță un aspect pozitiv în crearea unui proces acceptabil din punct de vedere ecologic. A fost stabilit, că după îndepărtarea catalizatorului din amestecul de reacție prin filtrare, spălare cu acetat de etil și uscarea la 110°C, este posibilă reutilizarea acestuia până la cinci cicluri, fără scăderea activității catalitice.

În prezent, derivații de 1,2,4-triazolici sunt folosiți pe scară largă atât în agricultură, cât și în medicină ca medicamente bactericide, antifungice, anticancerigene, antitumorale, antiinflamatoare, anticonvulsivante, antivirale și antituberculoase. Până în prezent, au fost propuse multe metode pentru sinteza compușilor din această clasă, care includ atât construcția inelului triazolic, cât și prepararea derivaților pe baza 1,2,4-triazolului.

Pentru soluționarea acestei probleme au fost alese azidele izomerice **14** și **15**. Metodele cunoscute pentru obținerea azidelor **14** și **15** cuprind deschiderea inelului epoxidic **13** prin acțiunea NaN₃ în prezența NH₄Cl la refluxare în alcoolii, sau agitarea cu NaN₃ într-o soluție apoasă de acid acetic la 30°C. Am constatat, că în primul caz se formează un amestec aproximativ egal de azide (randament total 36%), în timp ce în al doilea caz a fost atestată obținerea regiospecifică a compusului **14** (randament 61%).

4. Descrierea colaborării între organizația din RM și organizațiile partenere după caz (specificul și continuitatea colaborării)

Institutul de Chimie, Chisinau, Moldova

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu" Chisinau, Moldova

5. Diseminarea rezultatelor obținute în formă de publicații

Teze ale conferințelor științifice în lucrările conferințelor științifice internaționale (peste hotare)

1. CIOBANU N.GH., MACAEV F.Z. New catalytic conditions in the synthesis of dihydropyrimidine derivatives. International conference "Modern problems of theoretical and experimental chemistry" devoted to the 90th anniversary of academician Rafiga Aliyeva, State University, Baku, Azerbaijan, 29-30.09.2022, p. 301. <https://kindcongress.com/event/international-conference-of-modern-problems-of-theoretical-and-experimental-chemistry/>
2. ЧОБАНУ Н.Г., МАКАЕВ Ф.З. Синтез и активность 3,4-дигидропиримидин-2-онов(тионов) с применением различных органических катализаторов. ФГБОУВО 87-ая всероссийская научная конференция студентов и молодых учёных с международным участием «Вопросы теоретической медицины». Уфа, Россия, 16-17.05.2022. Сборник материалов конференции. с.191-195. https://vk.com/doc549429700_641804877?hash=yzHSykJEJAzrRTqEmGyh00LY1HcqGz zKQ6UZ1e4TIXts&dl=G4YDCOJYHE4DANI:1667238070:QyPDktOOPvH9M0JctMb0

interaction with NaN_3 , HCl/MeOH and quaternization. The research of the rational ways of synthesis of the new azoderivatives of (+)-carene was carried out, in order to use them in cycloaddition reactions with the participation of the precursors of the androstane series.

Conducătorul de proiect F. Oncey

/ prof., dr. hab. Fliur MACAEV

Data: 15.11.2022 _____

LS



**Lista lucrărilor științifice, științifico-metodice și didactice
publicate în anul de referință în cadrul proiectului bilateral „Sinteza steroizilor cu
fragment azolic în ciclul D și/sau în catena laterală în calitate de compuși de bază pentru
crearea medicamentelor destinate tratamentului cancerului de prostată”**

22.80013.8007.1BL

Teze ale conferințelor științifice

în lucrările conferințelor științifice internaționale (peste hotare)

1. CIOBANU N.GH., MACAEV F.Z. New catalytic conditions in the synthesis of dihydropyrimidine derivatives. International conference “Modern problems of theoretical and experimental chemistry” devoted to the 90th anniversary of academician Rafiga Aliyeva, STATE UNIVERSITY, Azerbaijan, Baku, 29-30.09.2022, p. 301.
<https://kindcongress.com/event/international-conference-of-modern-problems-of-theoretical-and-experimental-chemistry/>
2. ЧОБАНУ Н.Г., МАКАЕВ Ф.З. Синтез и активность 3,4-дигидропиримидин-2-онов(тионов) с применением различных органических катализаторов. ФГБОУВО 87-ая всероссийская научная конференция студентов и молодых учёных с международным участием «Вопросы теоретической медицины”. Сборник конференции 16-17.05.22, с.191-195.
https://vk.com/doc549429700_641804877?hash=yzHSykJAZrRTqEmGyh00LY1HcqGzzKQ6UZ1e4TIXts&dl=G4YDCOJYHE4DANI:1667238070:QyPDktOOPvH9M0JctMb01h3QOgPDxePMjGL9FK5NFez&api=1&no_preview=1

Executarea devizului de cheltuieli, conform anexei nr. 2.3 din contractul de finanțare
Cifrul proiectului: 22.80013.8007.1BL

Cheltuieli, mii lei						
Denumirea	Cod		Anul de gestiune			
	Eco (k6)	Aprobat	Modificat +/-	Precizat	Executat	Sold
Deplasări în interes de serviciu peste hotare	222720	39.5	-39.5	-	-	-
Servicii de cercetări științifice	222930	167.1	+27.6	194.7	162.4	32.3
Procurarea masinilor si utilajelor	314110	93.4		93.4	93.4	-
Procurarea materialelor pentru scopuri didactice, științifice și alte scopuri	335110	30.0	+11.9	41.9	41.9	-
Total		330.0		330.0	297.7	32.3

Conducătorul organizației *Aculina ARÎCU* dr.hab. Aculina ARÎCU

Contabil șef *Viorica BOLOGA* / Viorica BOLOGA

Conducătorul de proiect *Fliur MACAEV* / dr.hab. Fliur MACAEV

Data: 07.11.2022



Componența echipei proiectului

Cifrul proiectului 22.80013.8007.1BL

Echipa proiectului conform contractului de finanțare pentru anul 2022 (la semnarea contractului)						
Nr	Nume, prenume (conform contractului de finanțare)	Anul nașterii	Titlul științific	Norma de muncă conform contractului	Data angajării	Data eliberării
1	Macaev Fliur	1959	dr. hab.	-	01.01.2022	31.12.2022
2	Sucman Natalia	1983	dr.	0,5	01.01.2022	31.12.2022
3	Stingaci Eugenia	1938	dr.	0,5	01.01.2022	31.12.2022
4	Pogrebnoi Vsevolod	1987	dr.	0,5	01.01.2022	31.12.2022
5	Zveaghințeva Marina	1973	f/t	0,5	01.01.2022	31.12.2022
6	Bilan Dmitrii	1987	f/t	0,5	01.01.2022	31.12.2022

Pondereea tinerilor (%) din numărul total al executorilor conform contractului de finanțare	50%
---	-----

Modificări în componența echipei pe parcursul anului 2022					
Nr	Nume, prenume	Anul nașterii	Titlul științific	Norma de muncă conform contractului	Data angajării
1					
2					

Pondereea tinerilor (%) din numărul total al executorilor la data raportării	50%
--	-----

Conducătorul organizației  dr.hab. Aculina ARÎCUContabil șef  Viorica BOLOGAConducătorul de proiect  dr.hab. Fliur MACAEV

Data: 15.11.2022

