
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Contribuții la dezvoltarea unor noi molecule azolice cu potențial antiinflamator

Doctorand **Cătălin Araniciu**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Ovidiu Oniga**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Inflamația: aspecte fiziopatologice	19
1.1. Prostanoidele	20
1.1.1. Biosinteza prostanoidelor	20
1.1.2. Rolul fiziopatologic al prostanoidelor	22
1.2. Oxidul nitric	24
1.2.1. Biosinteza oxidului nitric	25
1.2.2. Rolul fiziopatologic al oxidului nitric	26
1.3. Inter-relațiile dintre prostanoid și oxidul nitric	27
2. Antiinflamatoare nonsteroidiene	
2.1. Mecanismul farmacologic de acțiune	29
2.2. Structura enzimatică a ciclooxigenazei	29
2.3. Modul de legare al AINS la nivelul COX	30
2.4. Efecte farmacologice și acțiuni terapeutice	32
2.5. Reacții adverse	33
2.6. Antiinflamatoare nonsteroidiene nespecifice	35
2.7. Antiinflamatoare nonsteroidiene COX-2 specifice	37
3. Direcții actuale ale cercetării în domeniul AINS	
3.1. Cercetări în domeniul inhibitorilor selectivi ai COX-2	39
3.2. Cercetări în domeniul inhibitorilor selectivi ai iNOS	41
3.3. Cercetări în domeniul inhibitorilor duali ai COX-2 și iNOS	43
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	47
2. Metodologie generală	49
2.1. Sinteza chimică, izolarea și purificarea compușilor intermediari și finali	49
2.2. Determinarea proprietăților fizico-chimice și spectrale	49
2.3. Determinarea activității antiradicalice față de radicalul DPPH	51
2.4. Determinarea activității antiinflamatoare	54
2.4.1. Evaluarea răspunsului medular de fază acută	55

2.4.2. Testul de fagocitoză <i>in vitro</i>	56
2.4.3. Evaluarea sintezei de oxid nitric seric	56
2.4.4. Evaluarea stresului oxidativ	57
2.5. Prelucrarea statistică a datelor	59
3. Studiul 1 - Sinteza, caracterizarea fizico-chimică și evaluarea activității antiradicalice și antiinflamatoare a unor derivați 2-(trimetoxifenil)-4-R₁-5-R₂-tiazolici	61
3.1. Introducere	61
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	62
3.3. Material și metodă	63
3.3.1. Sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală	63
3.3.2. Determinarea activității antiradicalice față de radicalul DPPH	64
3.3.3. Determinarea activității antiinflamatoare	64
3.3.4. Prelucrarea statistică a datelor	65
3.4. Rezultate	65
3.4.1. Sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală	65
3.4.2. Determinarea activității antiradicalice față de radicalul DPPH	70
3.4.3. Determinarea activității antiinflamatoare	71
3.5. Discuții	78
3.6. Concluzii	80
4. Studiul 2 - Sinteza, caracterizarea fizico-chimică și evaluarea activității antiradicalice și antiinflamatoare a unor derivați bistiazolici	81
4.1. Introducere	81
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	82
4.3. Material și metodă	83
4.3.1. Sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală	83
4.3.2. Determinarea activității antiradicalice față de radicalul DPPH	86
4.3.3. Determinarea activității antiinflamatoare	86
4.3.4. Prelucrarea statistică a datelor	86
4.4. Rezultate	86
4.4.1. Sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală	86
4.4.2. Determinarea activității antiradicalice față de radicalul DPPH	94
4.4.3. Determinarea activității antiinflamatoare	96
4.5. Discuții	104
4.6. Concluzii	108

5. Studiul 3 - Sinteza, caracterizarea fizico-chimică și evaluarea activității antiradicalice a unor derivați 5-tiazolil-carbohidrazon-N-alil-tiazolinici	111
5.1. Introducere	111
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	112
5.3. Material și metodă	113
5.3.1. Sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală	113
5.3.2. Determinarea activității antiradicalice față de radicalul DPPH	115
5.4. Rezultate	115
5.4.1. Sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală	115
5.4.2. Determinarea activității antiradicalice față de radicalul DPPH	120
5.5. Discuții	122
5.6. Concluzii	123
6. Studiul 4 - Sinteza, caracterizarea fizico-chimică și evaluarea activității antiradicalice a unor derivați 2-(tiazol-5-il)-1,3,4-oxadiazolici	125
6.1. Introducere	125
6.2. Ipoteza de lucru/obiective	126
6.3. Material și metodă	127
6.3.1. Sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală	127
6.3.2. Determinarea activității antiradicalice față de radicalul DPPH	128
6.4. Rezultate	128
6.4.1. Sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală	128
6.4.2. Determinarea activității antiradicalice față de radicalul DPPH	133
6.5. Discuții	135
6.6. Concluzii	136
7. Discuții generale	137
8. Concluzii generale	139
9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	141
REFERINȚE	142

Cuvinte cheie: aril-tiazoli, bistiazoli, tiazolil-oxadiazoli, antiradicalic, antiinflamator, capacitate fagocitară, stres nitro-oxidativ.

Introducere

Obținerea unor noi molecule cu activitate AINS, caracterizate printr-un profil de siguranță superior a devenit o prioritate în domeniul chimiei medicamentului.

Astfel, în scopul optimizării profilului lor farmacologic am decis obținerea de compuși cu o specificitate mai redusă față de COX-2 dar cu menținerea unei selectivități ridicate.

De asemenea, am încercat obținerea de compuși care să prezinte mecanisme antiinflamatoare complementare sau conexe, cum ar fi capacitatea de a reduce hiperproducția de NO prin inhibarea selectivă a nitric oxid sintetazei inductibile (iNOS) sau capacitatea de a neutraliza direct speciile radicalice, prin intermediul unui efect antioxidant.

În scopul obținerii de molecule originale care să posede caracteristicile mai sus menționate am recurs la selectarea unor noi structuri de bază divers substituie cu grupării potențial farmacofore. Elementul structural comun este nucleul tiazolic datorită bioisosterismului cu heterocicli prezenți în structurile altor AINS și a experienței anterioare cu acest tip de compuși.

Contribuția personală

Ipoteza de lucru

Obiectivul cercetării a fost sinteza de noi molecule și determinarea potențialului antiinflamator al acestora. Pornind de la structura coxibilor, inhibitori selectivi ai COX-2, am decis să ne îndreptăm atenția spre obținerea de derivați diaril-heterociclici în care nucleul tiazolic reprezintă un element central, comun.

Pentru a evalua potențialul antiinflamator ne-am propus realizarea de farmacomodulări prin grefarea pe structura de bază, care poate conține un nucleu tiazolic, bistiazolic, tiazolil-oxadiazolic sau tiazolil-tiazolinic a unor substituenți variați. Astfel, am obținut molecule cu structură: 2-(3,4,5-trimetoxifenil)-tiazolică, 2'-fenil-2,4'-bistiazolică, 2'-fenil-2,5'-bistiazolică, 5-tiazolil-carbohidrazon-N-alil-tiazolinică, 2-(tiazol-5-il)-1,3,4-oxadiazolică.

Metodologia generală

Obținerea de molecule chimice noi a fost realizată prin metode de sinteză chimică variate. Evaluarea noilor structuri a fost realizată prin analize fizico-chimice și spectrale. În acest sens, pentru toți compușii noi au fost determinate următoarele: punctul de topire, analiza elementală cantitativă, spectrul de masă, spectrul de rezonanță magnetică de proton.

În vederea caracterizării cât mai complete a potențialului biologic al noilor compuși au fost aplicate atât o metodă de determinare a activității antiradicalice directe *in vitro* cât și o metodă de determinare a activității antiinflamatoare, realizată prin utilizarea unui model experimental de inflamației acute la șobolan. Evaluarea efectelor antiinflamatoare a fost efectuată prin măsurarea: răspunsului inflamator de fază acută medular, fagocitozei, stresului oxidativ și sintezei de oxid nitric. Compararea activității antiradicalice directe cu efectul asupra statusului oxidativ al serului animalelor tratate cu aceste molecule permite o mai bună caracterizare a potențialului biologic.

Studiul 1. Sinteza, caracterizarea fizico-chimică și evaluarea activității antiradicalice și antiinflamatoare a unor derivați 2-(trimetoxifenil)-4-R₁-5-R₂-tiazolici

Ipoteza de lucru

Au fost sintetizate molecule care “împrumută” elemente structurale de la o serie variată de AINS consacrate dar și de la molecule aflate încă în cercetare. De asemenea, s-a încercat și păstrarea unor similitudini structurale cu anumiți compuși care acționează ca inhibitori selectivi ai iNOS.

Compușii 2-(3,4,5-trimetoxifenil)-tiazolici au ca particularitate prezența în structură a nucleului fenil trimetoxilat, în scopul creșterii posibilităților de interacțiune cu situsul activ al enzimelor. De asemenea, în aceasta serie au fost sintetizați atât compuși biclici cât și compuși triciclici, în vederea determinării diferențelor de acțiune biologică dintre aceștia.

Material și metodă

Sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală

Sinteza chimică a derivaților 2-(3,4,5-trimetoxifenil)-4-R₁-5-R₂-tiazolici a fost realizată în două etape, având ca materie primă de start 3,4,5-trimetoxibenzonitrilul. Derivații finali au fost obținuți prin reacții de condensare de tip Hantzsch, între intermediarul tioamidic și diverși compuși α -halo-cetonici.

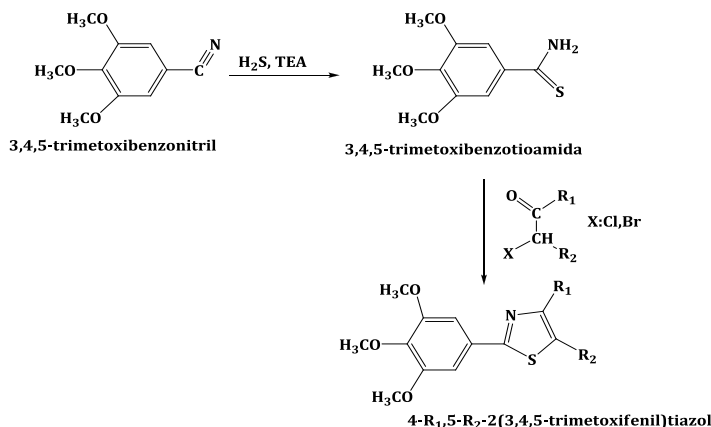


Fig.1. Schema de sinteză a derivaților 2-(3,4,5-trimetoxifenil)-4-R₁-5-R₂-tiazolici.

Determinarea activității antiradicalice față de radicalul DPPH

Determinarea activității antiradicalice directe a fost efectuată față de radicalul DPPH, utilizând metoda descrisă în capitolul de metodologie generală.

Determinarea activității antiinflamatoare

Potențialul antiinflamator a fost evaluat utilizând modelul experimental al inflamației acute la șobolan.

Rezultate

Sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală

Au fost obținute 13 noi molecule. Structurile propuse au fost confirmate prin analiza elementală cantitativă C,H,N,S, spectrometrie de masă și spectroscopie ¹H-RMN.

Determinarea activității antiradicalice față de radicalul DPPH

Compușii din această clasă au o activitate antiradicalică scăzută. Astfel, compușii **A6**, **A7**, **A8** și **A13** sunt singurii care prezintă o activitate antiradicalică modestă având IC_{50%} situat între 150-200 μg/mL. Restul compușilor sunt activi la concentrații foarte mari, ceea ce face ca efectul antiradicalic să fie considerat nesemnificativ.

Determinarea activității antiinflamatoare

În ceea ce privește răspunsul inflamator mediat celular, care a fost evaluat prin intermediul determinării răspunsului medular acut, acesta se poate considera inhibat atunci când există o scădere a numărului total de leucocite, pe seama reducerii proporției de neutrofile. Acest efect a fost atins de către toți compușii studiați, cu excepția compusului **A2** (nu a manifestat fenomenul de reducere a numărului total de leucocite) și a compușilor **A9**, **A11**, **A12** (scăderea numărului total de leucocite nu s-a datorat scăderii numărului de neutrofile).

Compușii **A3**, **A4**, **A8** și **A10** prezintă o corelație pozitivă între scăderea ponderii neutrofilelor în formula leucocitară și scăderea producției de nitriți și nitrați (r=0.7). De asemenea, pentru acești compuși există o corelație între scăderea procentului de

neutrofile, scăderea activității fagocitare și a indicelui fagocitar ($r=0.7-0.8$). Compușii **A3**, **A4** și **A8** prezintă și o corelație între reducerea numărului total de leucocite și reducerea indicelui de stres oxidativ ($r=0.7$).

Inhibarea producerii de NO se corelează cu inhibarea AF și a IF în cazul compușilor **A3** și **A8** ($r=0.8$). În același timp, pentru compușii **A3**, **A4**, **A5**, **A6**, **A7**, **A8**, și **A13** scăderea concentrației de nitriți și nitrați se corelează pozitiv cu reducerea stresului oxidativ și cu îmbunătățirea statusului oxidativ, așa cum este acesta estimat prin OSI.

Per ansamblu, toți compușii testați prezintă un anumit grad de activitate antiinflamatoare, determinând valori îmbunătățite ale parametrilor, față de cele obținute pentru lotul Inflamație. Activitatea antiinflamatoare cea mai proeminentă a fost observată la compușii **A3** și **A8**. Aceștia prezintă activitate superioară meloxicamului pentru toți parametri testați.

Compușii **A4**, **A5**, **A6** și **A7** manifestă o acțiune antiinflamatoare bună, dar mai puțin eficientă decât cea a meloxicamului, la doze echimoleculare. Studii suplimentare, cu doze mai mari de compuși, sunt necesare pentru a determina cu exactitate profilul antiinflamator al acestora.

Compușii **A9**, **A10**, **A11**, **A12** și **A13** au manifestat o acțiune antiinflamatoare modestă. Compusul **A13** are avantajul unei bune acțiuni de inhibare a producției de NO și este în același timp un bun antioxidant *in vivo*.

Concluzii

Au fost obținute 13 noi molecule cu structură de 2-(trimetoxifenil)-4-R₁-5-R₂-tiazol.

Determinările fizico-chimice și spectrale efectuate au dus la caracterizarea acestor compuși și la confirmarea structurilor moleculare propuse.

Determinările preliminare legate de potențialul antiradicalic al noilor molecule au relevat o variată activitate antiradicalică împotriva radicalului DPPH. Compușii **A6**, **A7**, **A8** și **A13** prezintă o activitate antiradicalică modestă, iar restul compușilor sunt activi la concentrații foarte mari, ceea ce face ca efectul antiradicalic să fie considerat nesemnificativ.

Toți compușii testați au prezentat un anumit grad de activitate antiinflamatoare, determinând o îmbunătățire a parametrilor evaluați în raport cu lotul Inflamație. Astfel, compușii **A3**, **A4**, **A8** și **A10** au avut un efect mai bun decât meloxicamul asupra răspunsului medular de fază acută. Compușii **A3**, **A8**, **A10** au avut o activitate superioară meloxicamului în reducerea AF și IF. Toți compușii sintetizați au redus sinteza de NO, însă doar compusul **A13** a avut o activitate superioară meloxicamului, în timp ce compusul **A3** s-a comportat similar cu meloxicamul. Toți compușii sintetizați au îmbunătățit statusul oxidativ, iar compușii **A3**, **A4**, **A5**, **A6**, **A7**, **A8**, și **A13** au avut o acțiune superioară standardului.

Compușii **A4**, **A5**, **A6** și **A7** manifestă o acțiune antiinflamatoare bună, dar mai puțin eficientă decât cea a meloxicamului, la doze echimoleculare. Compușii **A3** și **A8** au demonstrat acțiunea antiinflamatoare cea mai bună, având valori superioare sau similare meloxicamului pentru toți parametrii testați.

Studiul 2. Sinteza, caracterizarea fizico-chimică și evaluarea activității antiradicalice și antiinflamatoare a unor derivați bistiazolici

Ipoteza de lucru

Derivații bistiazolici au fost concepuți cu scopul de a investiga modificarea efectelor biologice ca urmare a substituției heterociclului central din modelul structural al coxibilor cu sisteme heterociclice de tip 4,2 sau 5,2 bistiazolice. Sistemele bistiazolice au fost substituite cu 1 sau 2 resturi aril, pentru a evalua diferențele biologice dintre compușii triciclici respectiv cei tetraciclici

Material și metodă

Sinteză chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală

Sinteză 4,2- bistiazolilor este un proces complex care se realizează în șase etape distincte. Derivații bistiazolici au fost obținuți prin condensarea Hantzsch a intermediarului cheie, reprezentat de 2-feniltiazolil-4-carbotioamidă (5'), cu o serie de α -bromo-cetone.

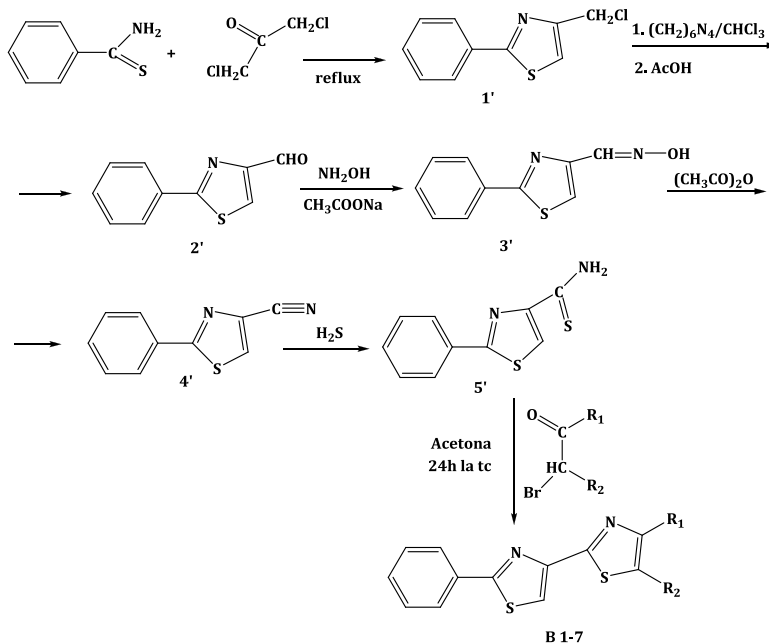


Fig.2. Schema de sinteză a 4,2-bistiazolilor

Obținerea 5,2-bistiazolilor presupune cinci etape de sinteză. Derivații finali au fost obținuți prin reacții de condensare Hantzsch între intermediarul tioamidic și diverși compuși α -halo-cetonici

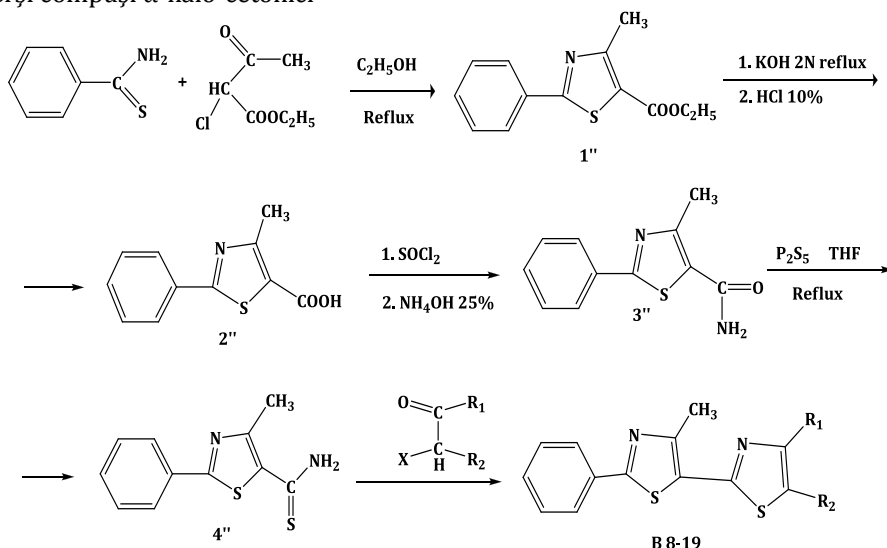


Fig.3. Schema de sinteză a 5,2 -bistiazolilor

Determinarea activității antiradicalice față de radicalul DPPH

Determinarea activității antiradicalice directe a fost efectuată față de radicalul DPPH, utilizând metoda descrisă în capitolul de metodologie generală.

Determinarea activității antiinflamatoare

Potențialul antiinflamator a fost evaluat utilizând modelul experimental al inflamației acute la șobolan.

Rezultate

Sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală

Au fost obținute 19 noi molecule. Șapte din noile molecule au o structură de 4,2-bistiazol, iar unsprezece sunt 5,2-bistiazoli.

Structurile propuse au fost confirmate prin analiza elementală cantitativă de C, H, N, S, spectrometrie de masă și spectroscopie $^1\text{H-RMN}$.

Determinarea activității antiradicalice față de radicalul DPPH

Rezultatele obținute în urma determinărilor privind acțiunea antiradicalică directă, *in vitro*, au relevat diferențe substanțiale între $\text{IC}_{50\%}$ corespunzătoare acestor molecule. Acestea variază între 120 $\mu\text{g/ml}$ pentru compusul **B12** și 1554 $\mu\text{g/ml}$ pentru compusul **B17**.

Doi dintre compușii bistiazolici, respectiv **B4** și **B12**, prezintă o activitate antiradicalică moderată. Restul compușilor pot fi considerați ca lipsiți de activitate antiradicalică, din cauza concentrațiilor mari necesare obținerii efectului scontat.

Determinarea activității antiinflamatoare

Compușii din seria 4,2- bistiazolilor (**B1-7**) manifestă în general o acțiune antiinflamatoare modestă. Majoritatea compușilor nu determină o scădere semnificativă a neutrofilelor și/sau a leucocitelor totale. Excepția este reprezentată de compusul **B6**, care scade procentul de neutrofile mai puternic decât meloxicamul.

În ceea ce privește statusul oxidativ, cu excepția compusului **B6**, toți derivații reduc stresul oxidativ. Compușii **B3**, **B4** și **B5** au o activitate antioxidantă *in vivo* cel puțin egală cu cea a meloxicamului. Toți compușii din această serie reduc semnificativ AF și IF. În ceea ce privește reducerea producției de NO, ea este realizată doar de compușii **B1**, **B2**, **B6** și **B7**. Având în vedere aceste rezultate, putem observa că reducerea fagocitozei se datorează, pentru compușii **B1**, **B2** și **B7**, scăderii stresului oxidativ și a NO, pentru compușii **B3**, **B4** și **B5** scăderii stresului oxidativ, iar în cazul compusului **B6** doar scăderii sintezei de NO.

Seria 5,2- bistiazolilor (**B8-19**) a demonstrat o acțiune antiinflamatoare variată. Cei mai activi reprezentanți s-au dovedit a fi bistiazolii **B16-19** care au prezentat o acțiune semnificativ mai bună sau cel puțin similară față de meloxicam, standardul antiinflamator. Aceștia au manifestat o bună corelație între toate activitățile antiinflamatoare.

O activitate antiinflamatoare bună a prezentat și compusul **B8**. Acesta a manifestat corelații între diferitele acțiuni, dar nu a dovedit efecte superioare meloxicamului, la aceleași doze. Pentru stabilirea exactă a potențialului antiinflamator, este nevoie de refacerea determinărilor la doze mai crescute.

Producția de NO a fost inhibată semnificativ doar de bistiazolii **B8** și **B16-19**. Reducerea stresului oxidativ global a fost realizată de majoritatea compușilor, cu excepția derivaților **B13**, **B14** și **B15**. De asemenea, toți 5,2- bistiazolici reduc AF iar majoritatea reduc și IF (excepție **B14** și **B15**).

În ansamblu, efectul antiinflamator de bază, reducerea numărului total de leucocite prin scăderea neutrofilelor, a fost identificat la compușii **B6**, **B8**, **B11**, și **B16-19**. Dintre aceștia, compusul **B6** a prezentat activități corelate, cu excepția creșterii masive a TOS, fapt care a determinat alterarea OSI. Compusul **B11** a reușit să coreleze majoritatea activităților antiinflamatoare cu excepția lipsei de activitate asupra producției de NO și asupra creșterii TOS, dar cu scăderea statusului oxidativ global.

Compușii **B8** și **B16-19** au avut corelații între toate activitățile antiinflamatoare, manifestând efecte susținute, de intensitate variabilă.

Activitatea superioară meloxicamului, a compușilor triciclici (**B16-19**), sugerează că aceștia ar putea acționa prin inhibarea COX. Lipsa de corelații ale efectelor antiinflamatoare a compușilor omologi din cele două serii sugerează că aceștia adoptă conformații distincte, ceea ce determină diferențe ale potențialului de interacțiune cu țintele biologice.

Concluzii

Au fost obținuți 19 compuși noi cu structură bistiazolică, dintre care 7 compuși au un schelet de bază 4,2 bistiazolic și 11 compuși sunt de tip 5,2 bistiazolic.

Determinările fizico-chimice și spectrale efectuate au dus la caracterizarea acestor compuși și la confirmarea structurilor moleculare propuse.

Determinările preliminare legate de potențialul antiradicalic direct al noilor bistiazoli au relevat o activitate redusă. Compușii **B4** și **B12** manifestă o activitate moderată, în timp ce restul bistiazolilor au o activitate antiradicalică directă ne semnificativă.

Potențialul antiinflamator al celor 19 molecule noi este variat. Activitatea antiinflamatoare cea mai bună a fost obținută pentru compușii **B8** și **B16-19**. Aceștia au prezentat o activitate superioară sau cel puțin similară standardului meloxicam.

Studiul 3. Sinteza, caracterizarea fizico-chimică și evaluarea activității antiradicalice a unor derivați 5-tiazolil-carbohidrazon-N-alil-tiazolinici

Ipoteza de lucru

Compușii 5-tiazolil-carbohidrazon-N-alil-tiazolinici au fost proiectați prin similitudine cu meloxicamul. Acești derivați sunt tetraciclici și prezintă o grupare carbohidrazonică centrală, ceea ce le conferă un volum molecular ridicat, flexibilitate moleculară mărită și implicit posibilități crescute de interacțiune cu țintele biologice. Restul N-alil a fost introdus cu scopul creșterii activității antiradicalice directe.

Material și metodă

Sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală

Derivații de tip 5-tiazolil-carbohidrazon-N-alil-tiazolinic au fost obținuți prin intermediul unui proces elaborat de sinteză care cuprinde 4 etape cheie, după cum se poate observa în figura 4.

Determinarea activității antiradicalice față de radicalul DPPH

Determinarea activității antiradicalice directe a fost efectuată față de radicalul DPPH, utilizând metoda descrisă în capitolul de metodologie generală.

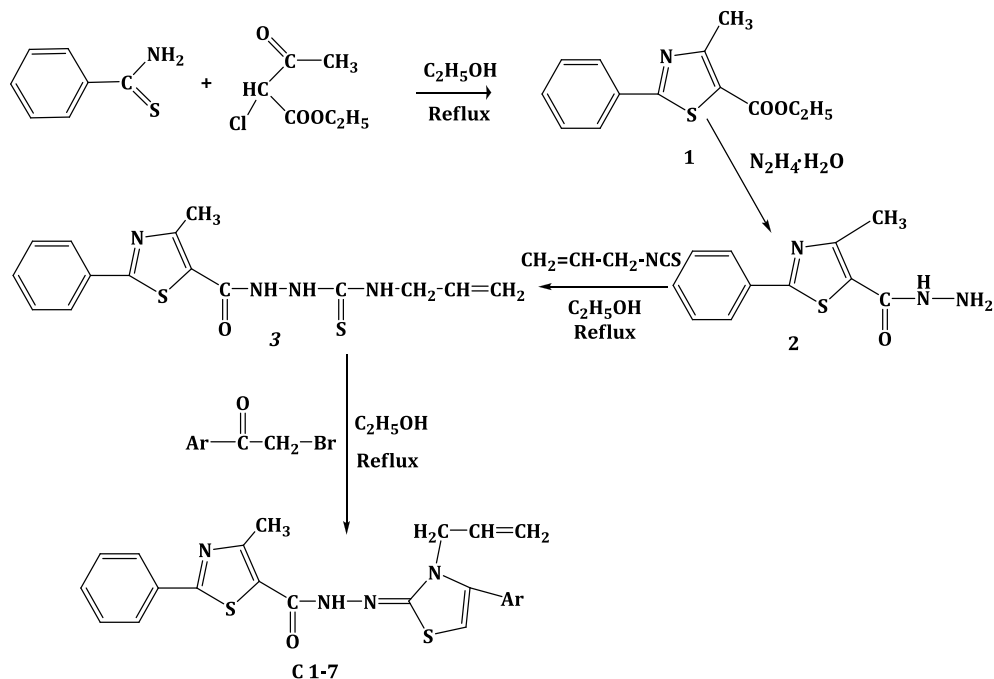


Fig.4. Schema de sinteză a derivaților 5-tiazolil-carbohidrazon-N-alil-tiazolinici

Rezultate

Sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală

Au fost obținute 7 noi molecule cu structură de 5-tiazolil-carbohidrazon-N-alil-tiazolinică. Structurile propuse au fost confirmate prin analiza elementală cantitativă de C, H, N, S, spectrometrie de masă și spectroscopie ¹H-RMN.

Determinarea activității antiradicalice față de radicalul DPPH

Toți compușii pentru care aceasta metodă a putut fi aplicată au demonstrat o activitate antiradicalică foarte bună.

Cele mai active molecule par să fie C5 și C3. Efectul antioxidant al acestor molecule este similar analogului de vitamina E, Trolox, la concentrații masice egale. De asemenea, efectul antioxidant este net superior BHT-ului, cei doi compuși sunt activi la concentrații molare de 3 ori mai mici decât standardul antioxidant BHT.

Compușii C2 și C6 prezintă o acțiune intermediară între BHT și Trolox, raportat la concentrațiile masice. În ceea ce privește raportul dintre concentrațiile micromolare care determină efecte antiradicalice similare, se constată că cei doi compuși sunt de 2 ori mai activi decât BHT.

Compușii **C4** și **C7** sunt activi la concentrații masice ușor mai ridicate decât BHT și Trolox. Din punct de vedere al concentrațiilor micromolare se poate aprecia că cei doi derivați au un efect similar Trolox-ului și net superior BHT-ului (activi la concentrații micromolare mai mici cu 50% față de acesta).

Concluzii

În urma aplicării unei metode de sinteză formată din patru etape distincte s-au obținut 7 molecule noi cu structură de bază de tip 5-tiazolil-carbohidrazon-N-alil-tiazolinic.

Determinările fizico-chimice și spectrale efectuate au dus la caracterizarea acestor compuși și la confirmarea structurilor moleculare propuse.

Determinările preliminare legate de potențialul antiradicalic al noilor molecule au relevat o foarte bună activitate antiradicalică împotriva radicalului DPPH. Toți compușii prezintă o activitate superioară standardului antiradicalic BHT, la concentrații echimoleculare. Cei mai activi compuși au acțiune de până la 3 ori mai bună decât standardul BHT.

Studiul 4. Sinteza, caracterizarea fizico-chimică și evaluarea activității antiradicalice a unor derivați 2-(tiazol-5-il)-1,3,4-oxadiazolici

Ipoteza de lucru

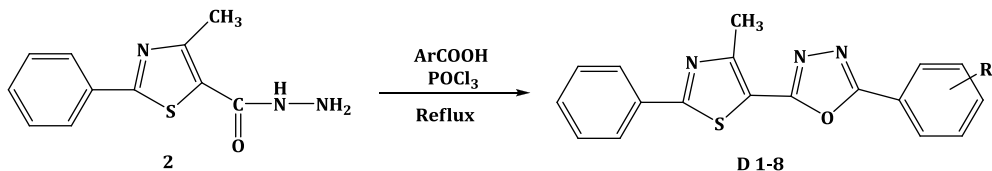
Compușii 2-(tiazol-5-il)-1,3,4-oxadiazolici au fost sintetizați pentru a evalua modificările activității biologice care apar datorită înlocuirii heterociclului central din modelul 1,2-diaril-heterociclic al coxibilor cu un sistem de tip 2-(tiazol-5-il)-1,3,4-oxadiazolic. Sistemul heterociclic central este la rândul său disubstituit cu resturi arilice variate.

Material și metodă

Sinteza chimică, caracterizare fizico-chimică și spectrală

Sinteza 2-(tiazol-5-il)-1,3,4-oxadiazolilor a fost realizată în 3 etape. Primele două etape au presupus obținerea 2-fenil-4-metil-1,3-tiazol-5-carbohidrazidei și au fost descrise în capitolul anterior.

Compusul 5-carbohidrazidic obținut (**2**) a fost supus unei reacții de condensare cu diverși acizi carboxilici, în prezența oxiclururii de fosfor, pentru a genera o serie de 2-(tiazol-5-il)-1,3,4-oxadiazoli.



Determinarea activității antiradicalice față de radicalul DPPH

Determinarea activității antiradicalice directe a fost efectuată față de radicalul DPPH, utilizând metoda descrisă în capitolul de metodologie generală.

Rezultate

Sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală

Au fost obținute 8 noi molecule. Din punct de vedere structural, moleculele obținute prezintă o structură de bază comună, reprezentată de restul de 2-(2-fenil-4-metil-1,3-tiazol-5-il)-1,3,4-oxadiazol care în poziția 5 a nucleului 1,3,4-oxadiazolic prezintă diverși substituenți care conțin 1 nucleu aromatic sau heteroaromatic.

Structurile propuse au fost confirmate prin analiza elementală, spectrometrie de masă și spectroscopie $^1\text{H-RMN}$.

Determinarea activității antiradicalice față de radicalul DPPH

Compușii **D1** și **D7** pot fi considerați ca având activitate antiradicalică ridicată, aceștia au demonstrat o activitate antiradicalică similară cu cea a standardului antioxidant BHT.

Compușii **D3** și **D5**, precum și compusul **D2**, au prezentat o activitate antiradicalică moderată.

Compușii **D4** și **D6**, precum și compusul **D8**, au avut activitatea antiradicalică cea mai slabă din această serie. Efectele lor antiradicalice pot fi considerate ne semnificative.

Concluzii

În urma aplicării unei metode de sinteză formată din trei etape distincte s-au obținut 8 noi molecule cu structură de bază 2-(tiazol-5-il)-1,3,4-oxadiazolică.

Determinările fizico-chimice și spectrale efectuate au dus la caracterizarea acestor compuși și la confirmarea structurilor moleculare propuse.

Determinările preliminare ale potențialului antiradicalic al noilor molecule au relevat o bună activitate antiradicalică împotriva radicalului DPPH pentru doi dintre derivații testați. Trei derivați au prezentat o acțiune antiradicalică moderată, iar alți trei derivați s-au dovedit a avea un impact ne semnificativ asupra reducerii radicalului DPPH.

Concluzii generale

Pornind de la datele existente în literatura de specialitate au fost propuse patru prototipuri structurale pentru compuși cu potențial antiinflamator.

Au fost stabilite, perfecționate și aplicate metodele de sinteză specifice obținerii de compuși cu structurile de bază vizate.

Au fost sintetizate 47 de molecule originale aparținând celor 4 prototipuri structurale, repatizate astfel:

- 13 molecule 2-(3,4,5-trimetoxifenil)-tiazolice (**A1-13**)
- 19 molecule 4,2 sau 5,2 bistiazolice (**B1-19**)
- 7 molecule 5-tiazolil-carbohidrazon-N-alil-tiazolinice (**C1-7**)
- 8 compuși 2-(tiazol-5-il)-1,3,4-oxadiazolici (**D1-8**)

Toți compușii sintetizați au fost supuși determinărilor fizico-chimice și spectrale (MS, ¹H-RMN) care au dus la caracterizarea acestor compuși și la confirmarea structurilor moleculare propuse.

Potențialul biologic a fost investigat prin **determinarea activității antiradicalice directe față de radicalul DPPH** pentru toate moleculele sintetizate. Au fost identificate un număr de opt molecule cu activitate antiradicalică ridicată (**C2-7, D1, D7**) și nouă molecule cu activitate moderată (**A6, A7, A8, A13, B4, B12, D2, D3 și D5**), restul compușilor manifestând o activitate nesemnificativă.

Determinarea activității antiinflamatoare *in vivo* a fost realizată prin utilizarea unui model experimental de inflamație acută la șobolan. Evaluarea efectelor a fost realizată prin măsurarea răspunsului inflamator de fază acută medular, a fagocitozei, stresului oxidativ și sintezei de oxid nitric. În urma acestor determinări au fost identificate un număr de șase molecule (**A3, A8, B16-19**) noi care prezintă un efect antiinflamator superior meloxicamului, la doze echimolare.

Sinteza unui număr mare de molecule care prezintă structuri de bază diferite și substituenți similari a făcut posibilă, prin analiza comparativă a potențialului biologic, stabilirea de relații structură chimică-activitate biologică. Aceste date pot contribui la optimizările moleculare vitoare, în scopul sintetizării de noi derivați cu profil biologic superior.

Cele șase moleculele noi, cu acțiune antiinflamatoare marcantă, pot fi considerate compuși cap de serie, care prin optimizări chimice ulterioare și/sau investigații suplimentare ar putea conduce la noi substanțe medicamentoase antiinflamatoare.

PhD THESIS SUMMARY

Contributions to the development of some new azole molecules with anti-inflammatory potential

PhD Student **Cătălin Araniciu**

PhD Supervisor **Prof. Dr. Ovidiu Oniga**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Inflammation: physiopathological aspects	19
1.1. Prostanoids	20
1.1.1. Prostanoids biosynthesis	20
1.1.2. Prostanoids physiopathology	22
1.2. Nitric oxide	24
1.2.1. Nitric oxide biosynthesis	25
1.2.2. Nitric oxide physiopathology	26
1.3. Prostanoids and nitric oxide inter-relations	27
2. Non-steroidian anti-inflammatory drugs	
2.1. The pharmacological mechanism of action	29
2.2. Ciclooxygenase macromolecular structure	29
2.3. NSAID – COX binding mode	30
2.4. Pharmacological effects and therapeutic actions	32
2.5. Adverse reactions	33
2.6. Non-specific non-steroidian anti-inflammatory drugs	35
2.7. COX-2 specific non-steroidian anti-inflammatory drug	37
3. Current research in the NSAID field	
3.1. COX-2 selective inhibitor research	39
3.2. iNOS selective inhibitor research	41
3.3. COX-2 and iNOS dual inhibitor research	43
PERSONAL CONTRIBUTIONS	
1. Hypothesis /objectives	47
2. General methodology	49
2.1. Chemical synthesis, isolation and purification of intermediary and final products	49
2.2. Physico-chemical and spectral characterisation	49
2.3. Determination of the antiradical activity against DPPH	51
2.4. Determination of the anti-inflammatory activity	54
2.4.1. The evaluation of the acute phase bone marrow response	55

2.4.2. <i>In vitro</i> phagocytosis test	56
2.4.3. Serum nitric oxide synthesis evaluation	56
2.4.4. Oxidative stress evaluation	57
2.5. Statistical analysis	59
3. Study 1. Synthesis, physico-chemical characterisation and antiradical and anti-inflammatory evaluation of some 2-(trimethoxyphenyl)-4-R₁-5-R₂-thiazoles derivatives	61
3.1. Introduction	61
3.2. Hypothesis /objectives	62
3.3. Materials and methods	63
3.3.1. Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterisation	63
3.3.2. Determination of the antiradical activity against DPPH	64
3.3.3. Determination of the anti-inflammatory activity	64
3.3.4. Statistical analysis	65
3.4. Results	65
3.4.1. Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterisation	65
3.4.2. Determination of the antiradical activity against DPPH	70
3.4.3. Determination of the anti-inflammatory activity	71
3.5. Discussions	78
3.6. Conclusions	80
4. Study 2. Synthesis, physico-chemical characterisation and antiradical and anti-inflammatory evaluation of some bis-thiazoles derivatives	81
4.1. Introduction	81
4.2. Hypothesis /objectives	82
4.3. Materials and methods	83
4.3.1. Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterisation	83
4.3.2. Determination of the antiradical activity against DPPH	86
4.3.3. Determination of the anti-inflammatory activity	86
4.3.4. Statistical analysis	86
4.4. Results	86
4.4.1. Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterisation	86
4.4.2. Determination of the antiradical activity against DPPH	94
4.4.3. Determination of the anti-inflammatory activity	96
4.5. Discussions	104
4.6. Conclusions	108

5. Study 3. Synthesis, physico-chemical characterisation and antiradical evaluation of 5-thiazolyl-carbohydrazon-N-allyl-thiazolines derivatives	111
5.1. Introduction	111
5.2. Hypothesis /objectives	112
5.3. Materials and methods	113
5.3.1 Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterisation	113
5.3.2. Determination of the antiradical activity against DPPH	115
5.4. Results	115
5.4.1. Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterisation	115
5.4.2 Determination of the antiradical activity against DPPH	120
5.5. Discussions	122
5.6. Conclusions	123
6. Study 4. Synthesis, physico-chemical characterisation and antiradical evaluation of 2-(thiazol-5-yl)-1,3,4-oxadiazoles	125
6.1. Introduction	125
6.2. Hypothesis /objectives	126
6.3. Materials and methods	127
6.3.1. Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterisation	127
6.3.2. Determination of the antiradical activity against DPPH	128
6.4. Results	128
6.4.1. Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterisation	128
6.4.2. Determination of the antiradical activity against DPPH	133
6.5. Discussions	135
6.6. Conclusions	136
7. General discussions	137
8. General conclusions	139
9. The originality and innovative contributions of the thesis	141
REFERENCES	142

Keywords : aryl-thiazoles, bis-thiazoles, thiazolyl-oxadiazoles, antiradical, anti-inflammatory, phagocytic capacity, nitro-oxidative stress.

Introduction

Obtaining new molecules, with NSAID activity that are characterized by a superior safety profile, has become a priority in the field of medicinal chemistry.

Thus, in order to optimize the pharmacological profile we decided to obtain compounds that have a reduced specificity towards COX-2, but which maintain an elevated selectivity.

In the same time, we tried to obtain compounds that possess complementary or connecting anti-inflammatory mechanisms, such as the ability to reduce NO hyperproduction by selectively inhibiting the inducible nitric oxide synthase or the capacity to directly neutralize free radical species, through an antioxidant effect.

In order to obtain original molecules with the above mentioned characteristics we selected new scaffolds diversely substituted with prospective pharmacophores. The common structural element is represented by the thiazole nucleus due to its bioisosterism with other heterocycles present in the structures of other NSAIDs and due to our previous experience with this type of compounds.

Personal contribution

Hypothesis

The aim of the research was to synthesize new molecules and to evaluate their anti-inflammatory potential. Starting from the structures of coxibes, COX-2 selective inhibitors, we decided to focus our attention towards obtaining diaryl-heterocyclic derivatives that possess a central thiazole moiety.

In order to evaluate the anti-inflammatory potential we decided to make a series of pharmaco-modulations on the central scaffold that can contain various cycles: thiazole, bis-thiazole, thiazole-oxadiazole or thiazolyl-thiazoline. Through this manner we obtained molecules with 2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-thiazole, 2'-phenil-2,4'-bis-thiazole, 2'-phenil-2,5'-bistiazole, 5-thiazolyl-carbohidrazon-N-allyl-thiazole, 2-(thiazol-5-yl)-1,3,4-oxadiazole structures.

General methodology

The synthesis of the new chemical molecules was achieved through various chemical synthesis routes. The evaluation of the new structures was performed by physico-chemical and spectral analysis. For this purpose melting point, quantitative elemental analysis, mass spectra and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy were performed.

In order to characterize more accurately the biologic potential of the new compounds we performed a method for the *in vitro* determination of the direct antiradical activity and a method for the evaluation of the anti-inflammatory potential by using an acute inflammation experimental model on rats. The evaluation of the anti-inflammatory effects was carried out through the measurement of acute phase bone marrow response, phagocytosis, oxidative stress and nitric oxide synthesis.

The comparison of the direct antiradical activity with the effect on serum nitro-oxidative status of animals treated with the new molecules allows for a more complete characterisation of the biological profile.

Study 1. Synthesis, physico-chemical characterisation and antiradical and anti-inflammatory evaluation of some 2-(trimethoxyphenyl)-4-R₁-5-R₂-thiazoles derivatives

Hypothesis

A series of molecules that “borrow” structural elements from different well-known NSAIDs and from molecules still in research were synthesized. In the same time, we tried to preserve some structural similarities with certain compounds that act as selective iNOS inhibitors.

The 2-(trimethoxyphenyl)-4-R₁-5-R₂-thiazoles derivatives are characterised by the presence of a central trimethoxylate phenyl ring, designed to increase the interaction possibilities with the active site of enzymes. In order to assess the potential differences in biological activity this series contains both bicyclic and tricyclic compounds.

Materials and methods

Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterisation

The chemical synthesis of the 2-(trimethoxyphenyl)-4-R₁-5-R₂-thiazoles derivatives was performed as a two stage process, that had 3,4,5-trimethoxybenzotrile as a starting point. The final derivatives were obtained through the Hantzsch condensation reaction, between a thioamide intermediary and various α -halo-ketones.

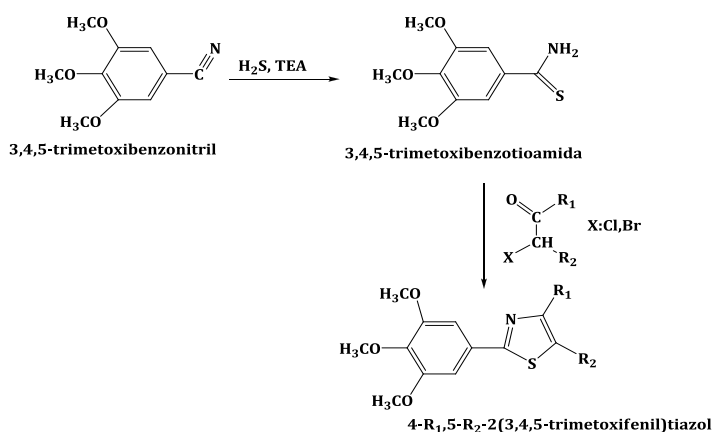


Fig.1. The synthesis scheme for the 2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4-R₁-5-R₂-thiazole derivatives.

Determination of the antiradical activity against DPPH

The determination of the antiradical activity was performed against the DPPH radical through the method previously described in the general methodology section.

Determination of the anti-inflammatory activity

The anti-inflammatory potential was evaluated using an acute inflammation model on rats.

Results

Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterisation

13 new molecules were obtained. The proposed structures have been confirmed by quantitative elemental analysis, mass spectrometry and $^1\text{H-NMR}$.

Determination of the antiradical activity against DPPH

The compounds from this structural class have a low direct antiradical activity.

Compounds **A6**, **A7**, **A8** and **A13** have a modest antiradical activity with $\text{IC}_{50\%}$ values between 150-200 $\mu\text{g/mL}$. The rest of the compounds are only active at high concentrations, which translates into an insignificant antiradical effect.

Determination of the anti-inflammatory activity

In regard of cell mediated inflammatory response, assessed by the acute phase bone marrow response, for a good anti-inflammatory response absolute leukocyte count should be lowered by the drop of neutrophils. This result is true for all the studied compounds, except **A2** (no significant reduction in leukocyte count) and **A9**, **A11**, **A12** (the reduction of leukocytes count was not due to neutrophils drop).

Compounds **A3**, **A4**, **A8** and **A10** show a good correlation between reduction of neutrophils percentage and the decrease of nitrite and nitrate production ($r=0.7$). For these compounds the neutrophils percentage drop also exhibits a positive correlation with the reduction of phagocytic activity PA and phagocytic index PI ($r=0.7-0.8$). Compound **A3**, **A4**, **A8** have a positive correlation between the absolute leukocyte count and the oxidative stress index OSI ($r=0.7$).

The inhibition of NO production shows a positive correlation with the decrease of PI and PA for compounds **3** and **8** ($r=0.8$). In the same time NO inhibition correlates positively with reduction of oxidative stress and improvement of the oxidative status, as depicted by OSI, for the compounds **A3**, **A4**, **A5**, **A6**, **A7**, **A8** and **A13**.

In general, all of the synthesized compounds have a degree of anti-inflammatory effects, causing the decrease in parameters under the values obtained for the **I** group. The most preeminent action can be observed in compounds **A3** and **A8** that show a more powerful anti-inflammatory effect than meloxicam, in all determined parameters.

Compounds **A4**, **A5**, **A6** and **A7** also had a good overall anti-inflammatory effect, but it was less efficient than meloxicam, at equimolar dose. Further studies with higher concentration of compounds are needed to determine the true potency of their anti-inflammatory action.

Compounds **A9**, **A10**, **A11**, **A12** and **13** had modest anti-inflammatory effects, except compound **13**, which had a good inhibitor of NO production and a potential *in vivo* anti-oxidant.

Conclusions

13 new molecules with a 2-(trimethoxyphenyl)-4-R₁-5-R₂-thiazole structure were obtained.

The physico-chemical and spectral determinations led to the characterisation and molecular structure validation for these compounds.

The preliminary evaluation of the direct antiradicalic potential of the new molecules revealed an varied radical scavenging activity against the DPPH radical. Compounds **A6**, **A7**, **A8** and **A13** have shown a modest antiradical activity, while the rest are only active at very high concentrations, rendering the antiradicalic effect insignificant.

All synthesized compounds had a degree of anti-inflammatory action. Compounds **A3**, **A4**, **A10** and **A8** had a better inhibitory effect on acute phase bone marrow response than the standard meloxicam. Compounds **A3**, **A8**, **A10** reduced the phagocytic capacity more than meloxicam. All compounds reduced the serum levels of nitrite and nitrate, compound **A13** had a significantly higher inhibition capacity than meloxicam, while compound **A3** had a similar effect with meloxicam. All studied compounds improved the oxidative stress index, with compounds **A3**, **A4**, **A5**, **A6**, **A7**, **A8** and **A13**, having a significantly better effect than meloxicam.

Compounds **A4**, **A5**, **A6** and **A7** had a good anti-inflammatory activity, but less effective than meloxicam at equimolar doses. The best anti-inflammatory compounds were **A3** and **A8**, which had a better effect than meloxicam, in all tested parameters.

Study 2. Synthesis, physico-chemical characterisation and antiradical and anti-inflammatory evaluation of some bis-thiazoles derivatives

Hypothesis

The bis-thiazoles derivatives were conceived for the purpose of investigating the alteration of biological effects as a result of exchanging the central heterocycle from the coxibe structural scaffolds with heterocyclic system such as 4,2 and 5,2 bis-thiazoles. To the main bis-thiazole moieties 1 or 2 aryl substituents were added, in order to better evaluate the differences in biological potential that occur in tricyclic and tetracyclic compounds.

Materials and methods

Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterisation

The synthesis of the 4,2-bis-thiazole derivatives is a complex process that undertakes six different steps. The final bis-thiazoles were obtained through the Hantzsch condensation reaction between a key intermediate 2-phenylthiazolyl-4-carbothioamide (5') and a series of α -bromo-ketones.

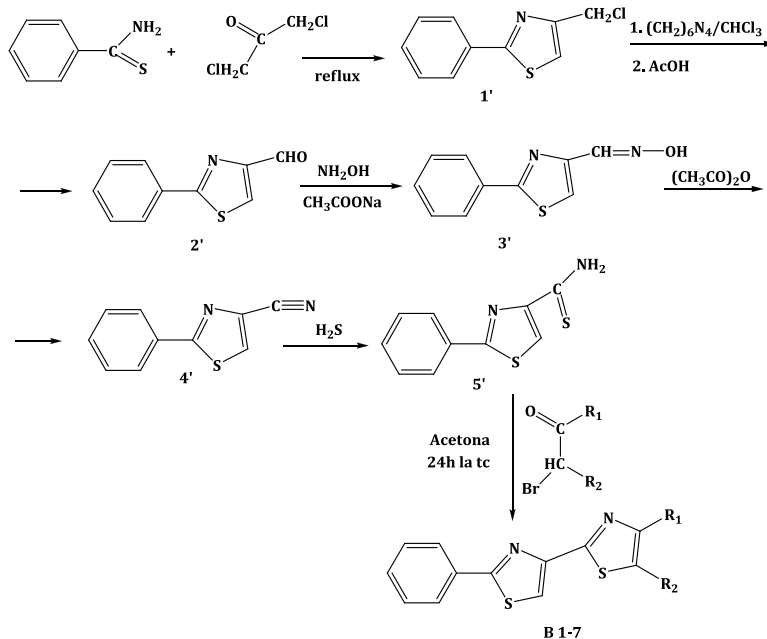


Fig.2. The synthesis scheme for the 4,2-bis-thiazoles

The 5,2-bsthiazoles synthesis comprises five distinct steps. The final compounds were obtained through the Hantzsch condensation reaction between a thioamide intermediary and various α -halo-ketones.

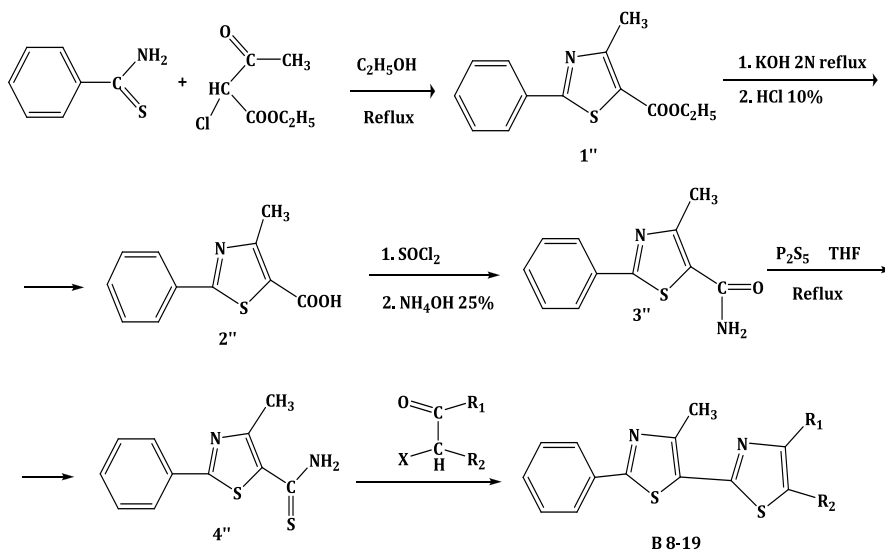


Fig.3. The synthesis scheme for the 5,2 -bis-thiazoles

Determination of the antiradical activity against DPPH

The determination of the antiradical activity was performed against the DPPH radical through the method previously described in the general methodology section.

Determination of the anti-inflammatory activity

The anti-inflammatory potential was evaluated using an acute inflammation model on rats.

Results

Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterisation

19 new molecules were obtained. Seven of the new molecules have a 4,2 bis-thiazole structure while eleven are 5,2 bis-thiazoles.

The proposed structures have been confirmed by quantitative elemental analysis, mass spectrometry and $^1\text{H-NMR}$.

Determination of the antiradical activity against DPPH

The results obtained from the evaluation of the *in vitro* direct antiradical activity revealed significant differences between the $\text{IC}_{50\%}$ values for these molecules. The values differ from 120 $\mu\text{g/ml}$ for compound **B12** up to 1554 $\mu\text{g/ml}$ for compounds **B17**.

Two of the bis-thiazoles, **B4** and **B12**, had a moderate radical scavenging activity. The rest of the compounds can be considered deprived of antiradical activity, because of the high concentrations necessary in order to obtain the desired effect.

Determination of the anti-inflammatory activity

The compounds from the 4,2-bis-thiazoles series (**B1-7**) have generally showed a modest overall anti-inflammatory activity. Most of them do not cause a significant reduction of neutrophils percentage and/or total leukocyte count. The notable exception was compound **B6** that caused a decline in neutrophils percentage more significantly than meloxicam.

Regarding the total serum oxidative stress, excepting **B6**, most of the compounds caused its reduction. For the compounds **B3**, **B4** and **B5** this has proved to be at least as good as that obtain for meloxicam. All compounds in this series significantly reduced PA and PI, while NO production was decreased just by compounds **B1**, **B2**, **B6** and **B7**. Considering these aspects we can conclude that for compounds **B1**, **B2** and **B7** the decrease in phagocytosis could be correlated with a decrease in serum oxidative stress and NO production, while for compounds **B3**, **B4** and **B5** it only correlated with a reduction of serum oxidant stress. Compound **B6** ability to decrease phagocytosis could be correlated just with a reduction of NO production.

The 5,2-bis-thiazoles (**B8-19**) showed a varied anti-inflammatory activity. The most active compounds proved to be compounds **B16-19**, that showed an activity significantly superior or at least equal to that of meloxicam. These compounds also correlated all tested anti-inflammatory mechanisms.

A good activity was also noticed for compound **B8**. This compound showed good correlations between the various activities but did not proved to be comparable to meloxicam. Future work using higher doses of this compound are needed in order to better characterise its activity.

NO production was decreased by compounds **B8** and **B16-19**. Most compounds reduced OSI and improved serum oxidative status, excepting **B13**, **B14** and **B15**. All 5,2-bis-thiazoles reduced PA and most of them also reduced PI (except **B14** and **B15**).

Overall, the primary anti-inflammatory mechanism through reduction of total leukocyte count by lowering of the neutrophils percentage was observed in compounds **B6**, **B8**, **B11** and **B16-19**. However, compound **B6** exhibited correlated activities with the exception of a major rise in TOS levels, which led to a negative impact on OSI. Compound **B11** managed to correlate most of the anti-inflammatory activities except the lack of activity in regard of diminishing NO production and TOS levels. Despite this, the global oxidative status was improved.

Compounds **B8** and **B16-19** correlated all anti-inflammatory activities, showing sustained effects or various intensities.

The good activity, superior to that of meloxicam, determined for the tricyclic compounds **B16-19** may suggest that they act through COX inhibition. The lack of correlation between the anti-inflammatory effects of homologues compounds from the two series suggest that they can adopt different conformations which lead to differences in the potential of interaction with biological targets.

Conclusions

19 new molecules with a bis-thiazoles scaffold were obtained. Seven of the new molecules have a 4,2 bis-thiazole structure while eleven are 5,2 bis-thiazoles.

The physico-chemical and spectral determinations led to the characterisation and molecular structure validation for these compounds.

The preliminary assessments regarding the direct antiradical potential of the new bis-thiazoles revealed a reduced activity. Compounds **B4** and **B12**, had a moderate radical scavenging activity, while the rest of the bis-thiazoles had a insignificant antiradical activity.

The anti-inflammatory potential of the 19 new molecules is varied. The best anti-inflammatory activity was observed for compounds **B8** and **B16-19**. These compounds showed an activity superior, or at least equal, to that of meloxicam.

Study 3. Synthesis, physico-chemical characterisation and antiradical evaluation of 5-thiazolyl-carbohydrazon-N-allyl-thiazolines derivatives

Hypothesis

The 5-thiazolyl-carbohydrazon-N-allyl-thiazolines compounds were design by similarity with meloxicam. These derivatives are tetracyclic and have a central carbohydrazone moiety. These characteristics grant a large molecular volume, increased molecular flexibility thus providing augmented interaction potential with biological targets. The N-allyl substituent was introduced with the aim of increasing direct antiradical activity.

Materials and methods

Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterisation

The 5-thiazolyl-carbohydrazon-N-allyl-thiazolines derivatives were obtained through an elaborate synthesis process that comprises 4 key steps, as can be observed in figure 4.

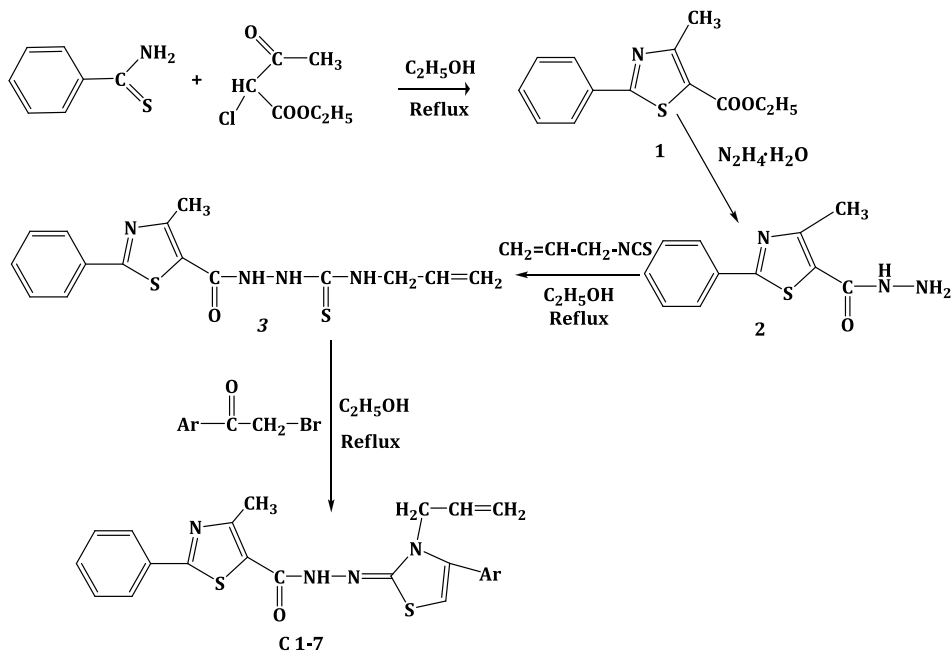


Fig.4. The synthesis scheme for the 5-thiazolyl-carbohydrazon-N-allyl-thiazolines derivatives

Determination of the antiradical activity against DPPH

The determination of the antiradical activity was performed against the DPPH radical through the method previously described in the general methodology section.

Results

Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterisation

We obtained 7 new molecules with a 5-thiazolyl-carbohydrazon-N-allyl-thiazolines structure. The proposed structures have been confirmed by quantitative elemental analysis, mass spectrometry and $^1\text{H-NMR}$.

Determination of the antiradical activity against DPPH

All compounds for which this method could be used showed a very good antiradical activity.

The most active molecules seem to be **C5** and **C3**. Their antioxidant effect is similar to that of Trolox, a vitamin E analogue, at equal mass concentrations. In the same time their antioxidant effect is decidedly superior to that of BHT, as the two compounds are active at molar concentrations three times smaller than the antioxidant standard BHT.

Compounds **C2** and **C6** had an intermediary activity between BHT and Trolox, when considering mass concentrations. If we consider the ratio between micro-molar

concentrations that exhibit similar radical scavenging effects, we can observe that the two compounds are 2 times more active than BHT.

Compounds **C4** and **C7** are active at slightly higher mass concentration than BHT and Trolox. When considering micro-molar concentrations it can be inferred that the two derivatives have a similar effect with TROLOX and a superior effect to that of BHT (they are active at micro-molar concentrations 50% smaller than it).

Conclusions

As a result of a synthesis method comprised of four distinct stages 7 new molecules with a 5-thiazolyl-carbohydrazon-N-allyl-thiazolines structure have been obtained.

The physico-chemical and spectral determinations led to the characterisation and molecular structure validation for these compounds.

The preliminary assessments of the free radical scavenging activity of the new molecules revealed a very good antiradical activity against the DPPH radical. All compounds had a superior activity to that of the antiradical standard BHT, at equimolar concentrations. The most active compounds are up to 3 times more potent than the standard, BHT.

Study 4. Synthesis, physico-chemical characterisation and antiradical evaluation of 2-(thiazol-5-yl)-1,3,4-oxadiazoles

Hypothesis

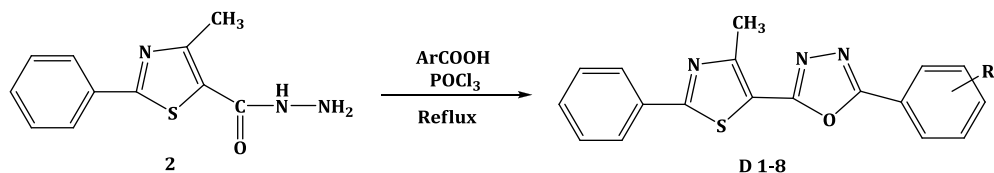
The 2-(thiazol-5-yl)-1,3,4-oxadiazole derivatives were synthesized in order to evaluate the alterations of biological activities that can occur due to the replacement of the central heterocycle from the 1,2 diaryl-heterocyclic scaffold of coxibes with a heterocyclic system represented by 2-(thiazol-5-yl)-1,3,4-oxadiazole. The central heterocyclic system can also present various aryl substituents.

Materials and methods

Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterisation

The synthesis of the 2-(thiazol-5-yl)-1,3,4-oxadiazoles was performed in three stages. The first two stages involved the synthesis of the 2-phenil-4-methyl-1,3-thiazol-5-carbohydrazide and have already been described in the last chapter.

The 5-carbohydrazide compound (**2**) was condensed with various carboxylic acids, in the presence of phosphorous oxychloride, in order to obtain a series of 2-(thiazol-5-yl)-1,3,4-oxadiazoles.



Determination of the antiradical activity against DPPH

The determination of the antiradical activity was performed against the DPPH radical through the method previously described in the general methodology section.

Results

Chemical synthesis, physico-chemical and spectral characterisation

We obtained 8 new molecules. From a structural point of view, the newly synthesized molecules have a common scaffold, represented by the 2-(4-methyl-2-phenyl-1,3-thiazol-5-yl)-1,3,4-oxadiazole that has an aromatic or heteroaromatic ring as a substituent in the 5 position.

The proposed structures have been confirmed by quantitative elemental analysis, mass spectrometry and ¹H-NMR.

Determination of the antiradical activity against DPPH

Compounds **D1** and **D7** can be considered as having a good antiradical activity due to their free radical scavenging activity that is similar to that of the antioxidant standard BHT.

Compounds **D3** and **D5**, as well as compound **D2**, showed a moderate antiradical activity.

Compounds **D4** and **D6**, as well as compound **D8**, had the weakest antiradical activity from this series. Their antioxidant activity can be considered insignificant.

Conclusions

By applying a synthesis method consisting of three distinct stages 8 new molecules with 2-(thiazol-5-yl)-1,3,4-oxadiazole structure were obtained.

The physico-chemical and spectral determinations led to the characterisation and molecular structure validation for these compounds.

The preliminary assessments of the antiradical potential of the new molecules revealed a good free radical scavenging activity against the DPPH radical for two of the tested compounds. Three compounds showed a moderate antiradical activity, while the others proved to have an insignificant impact on the reduction of the DPPH radical.

General conclusions

Starting from the data that exists in the scientific literature we proposed four major structural scaffolds for compounds with potential anti-inflammatory activity.

We established, perfected and applied a series of synthesis methods required for obtaining the desired structures.

We synthesized 47 original molecules belonging to the 4 structural scaffolds, as follows:

- **13** 2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-thiazole molecules (**A1-13**)
- **19** 4,2 or 5,2 bis-thiazoles molecules (**B1-19**)
- **7** 5-thiazolyl-carbohydrazon-N-allyl-thiazolines molecule (**C1-7**)
- **8** 2-(thiazol-5-yl)-1,3,4-oxadiazoles molecules (**D1-8**)

All synthesized compounds were subjected to physico-chemical and spectral (MS, $^1\text{H-NMR}$) determinations WICH led to the characterisation and molecular structure validation.

The biological potential was assessed by the **determination of the direct antiradical activity against DPPH for all synthesized molecules**. We identified a number of eight molecules with high antiradicalic activity (**C2-7**, **D1**, **D7**) and nine molecules with moderate activity (**A6**, **A7**, **A8**, **A13**, **B4**, **B12**, **D2**, **D3** and **D5**), the rest of the compounds showed an insignificant activity.

The determination of the *in vivo* anti-inflammatory activity was made by an acute inflammation experimental model on rats. The evaluation of the anti-inflammatory effects was carried out through the measurement of acute phase bone marrow response, phagocytosis, oxidative stress and nitric oxide synthesis.

As a results of these assessments we identified a number of six new molecules (**A3**, **A8**, **B16-19**) that exhibited an anti-inflammatory effect superior to that of equal doses of meloxicam.

The synthesis of a great number of molecules with different structural scaffolds but with similar substituents has made possible the ascertaining of chemical structure-biologic activity relationships through a comparative analysis of the biological potential. These data can contribute to the optimization of future molecules, in order to obtain new derivatives with an improved biological profile.

The six new molecules, characterized by an outstanding anti-inflammatory activity can be considered as leads, that through later chemical optimizations and/or additional investigation could generate new anti-inflammatory drugs.