
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Dezvoltarea chimică și farmacologică a unor noi aril- oximetil-azoli

Doctorand **Andreea-Iulia Pricopie**

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. Infecții fungice oportuniste. Tratament farmacologic și noi perspective.	19
1.1. Epidemiologie și impact socio-economic	19
1.2. Tratament farmacologic – limitări și perspective	20
1.2.1. Patogenicitatea tulpinilor fungice	20
1.2.2. Antifungice autorizate clinic și impactul răspunsului celular adaptativ asupra rezistenței la tratament	21
1.2.2.1. Rezistența la poliene	22
1.2.2.2. Rezistența la azoli	22
1.2.2.3. Rezistența la echinocandine	24
1.2.2.4. Rezistența la 5-fluorocitozină	24
2. Abordarea nevoii de noi antifungice. Cercetarea și dezvoltarea de noi medicamente.	25
2.1. Aspecte teoretice ale procesului de proiectare moleculară rațională	26
2.1.1. Ținta terapeutică. Posibilități de modulare a activității biologice	27
2.2. Proiectare moleculară rațională bazată pe structura țintei terapeutice	28
2.3. Proiectare moleculară rațională bazată pe liganzi	30
3. Cercetarea și dezvoltarea de antifungice cu acțiune terapeutică țintită	31
3.1. Noi potențiale ținte terapeutice pentru dezvoltarea de antifungice	31
3.1.1. Calea de semnalizare a trehalozei	32
3.1.2. Biosinteza sfingolipidelor	33
3.1.3. Calea de semnalizare a calcineurinei	34
3.2. Dezvoltarea de noi modulatori ai țintelor celulare validate ca medicamente antifungice	36
3.2.1. Calea de biosinteză a ergosterolului	36
3.2.2. Peretele celular fungic	38

3.2.2.1. Chitin-sintetaza	38
3.2.2.2. 1,3- β -glucan-sintetaza	39
3.3. Alternative terapeutice	40
3.3.1. Imunoterapie	40
3.3.1. Noi indicații terapeutice ale medicamentelor autorizate clinic	41

CONTRIBUȚIE PERSONALĂ

1. Obiective / Ipoteza de lucru	45
--	----

2. Metodologie generală	49
--------------------------------	----

3. Studiul 1. Proiectarea moleculară rațională bazată pe structura țintei celulare a unor noi derivați 3-mercapto-1,2,4-triazolici-N^4-substituiți ca potențiali agenți anti-<i>Candida</i>	53
---	----

3.1. Introducere	53
------------------	----

3.2. Obiective/Ipoteza de lucru	54
---------------------------------	----

3.3. Materiale și metodă	54
--------------------------	----

3.3.1. Sinteză chimică, caracterizare fizico-chimică și spectrală	55
---	----

3.3.2. Studii de andocare moleculară	57
--------------------------------------	----

3.3.3. Evaluarea activității antifungice <i>in vitro</i>	57
--	----

3.4. Rezultate și discuții	57
----------------------------	----

3.4.1. Sinteză chimică, caracterizare fizico-chimică și spectrală	57
---	----

3.4.2. Studii de andocare moleculară	65
--------------------------------------	----

3.4.3. Evaluarea activității antifungice <i>in vitro</i>	68
--	----

3.5. Concluzii	70
----------------	----

4. Studiul 2. Proiectarea moleculară rațională bazată pe liganzi a unor noi derivați 1,3-tiazolici- C^4-substituiți ca potențiali agenți anti-<i>Candida</i>	71
--	----

4.1. Introducere	71
------------------	----

4.2. Obiective/Ipoteza de lucru	72
---------------------------------	----

4.3. Materiale și metodă	73
--------------------------	----

4.3.1. Sinteză chimică, caracterizare fizico-chimică și spectrală	73
---	----

4.3.2. Evaluarea activității antifungice <i>in vitro</i>	76
--	----

4.3.3. Investigarea <i>in silico</i> a mecanismului de acțiune	76
--	----

4.4. Rezultate și discuții	76
----------------------------	----

4.4.1. Sinteză chimică, caracterizare fizico-chimică și spectrală	76
---	----

4.4.2. Evaluarea activității antifungice <i>in vitro</i>	82
--	----

4.4.3. Investigarea <i>in silico</i> a mecanismului de acțiune	83
--	----

4.5. Concluzii	85
----------------	----

5. Studiul 3. Studiul relației structură chimică-activitate biologică	87
--	----

a derivaților tiazolici C⁴-substituiți. Sinteza și prospectarea activității antifungice a unor noi molecule cu un profil structural optimizat

5.1. Introducere	87
5.2. Obiective/Ipoteza de lucru	88
5.3. Materiale și metodă	90
5.3.1. Sinteza chimică, caracterizare fizico-chimică și spectrală	90
5.3.2. Evaluarea activității antifungice <i>in vitro</i>	91
5.3.3. Studii de andocare moleculară	91
5.3.4. Analiza prin microscopie de fluorescență a permeabilizării membranare folosind iodura de propidium (IP)	91
5.4. Rezultate și discuții	92
5.4.1. Sinteza chimică, caracterizare fizico-chimică și spectrală	92
5.4.2. Evaluarea activității antifungice <i>in vitro</i>	95
5.4.3. Studii de andocare moleculară	96
5.4.4. Analiza prin microscopie de fluorescență a permeabilizării membranare folosind iodura de propidium (IP)	98
5.5. Concluzii	99
6. Studiul 4. Analiza profilului farmacocinetic și a proprietăților fizico-chimice direct corelate cu activitatea terapeutică a derivaților tiazolici anterior sintetizați	101
6.1. Introducere	101
6.2. Obiective/Ipoteza de lucru	102
6.3. Materiale și metodă	103
6.3.1. Studii ADMET <i>in silico</i>	103
6.3.2. Studiul interacțiunii cu proteinele plasmatice	103
6.4. Rezultate și discuții	104
6.4.1. Studii ADMET <i>in silico</i>	104
6.4.2. Studiul interacțiunii cu proteinele plasmatice	107
6.5. Concluzii	112
7. Concluzii generale	115
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	119
REFERINȚE	121

Cuvinte cheie: *Candida albicans*, proiectare moleculară rațională, ergosterol, permeabilizare membranară, andocare moleculară, spectrofluorimetrie

Introducere

Creșterea alarmantă a prevalenței infecțiilor nosocomiale cauzate de funghi din genul *Candida*, în contextul disponibilității unui număr redus de chimioterapice antimicotice autorizate clinic, respectiv rezistenței la tratament dezvoltate de agenți patogeni, subliniază nevoia pentru cercetarea și dezvoltarea de noi medicamente antifungice.

Cercetarea doctorală a avut ca obiectiv proiectarea moleculară rațională și sinteza chimică de noi compuși heterociclici azolici ca potențiali agenți terapeutici anti-*Candida*.

Stadiul actual al cunoașterii

Proiectarea moleculară rațională de noi antifungice care să acționeze selectiv asupra microorganismelor patogene este dificil de realizat, datorită similitudinilor, din punct de vedere al proceselor metabolice, între celulele fungice și cele ale organismului gazdă.

În acest moment, expansiunea cunoștințelor în domeniul genomicii, biologiei moleculare și patogenezei proceselor infecțioase, au permis identificarea unor căi metabolice specifice celulelor fungice, care pot fi utilizate drept ținte terapeutice pentru dezvoltarea de antifungice cu toxicitate selectivă. Însă, testarea în studii clinice a unor potențiali modulatori ai acestora este un proces dificil, ce presupune multe obstacole, astfel că un număr foarte redus dintre aceste molecule ajung să fie autorizate în terapie. Din acest motiv, o alternativă eficientă pentru dezvoltarea de noi antifungice este utilizarea, pentru designul rațional al acestora, a țintelor terapeutice validate, pentru care există inhibitori autorizați clinic.

Eficacitatea terapeutică remarcabilă a medicamentelor antifungice din clasa polienelor și azolilor justifică faptul că ergosterolul fungic și calea de biosinteză a acestuia, în mod particular, etapa catalizată de lanosterol- $C^{14}\alpha$ -demetilaza (CYP51), o hemoproteină cu funcție enzimatică din familia citocromului P450, reprezintă ținte terapeutice promițătoare pentru dezvoltarea de noi chimioterapice antimicotice. Disponibilitatea structurii tridimensionale a enzimei țintă (CYP51) a permis analiza exhaustivă, din punct de vedere topologic, a situsului catalitic, respective identificarea altor elemente structurale importante pentru funcția biologică, precum cavitățile sau buzunarele hidrofobe. Aceste date reprezintă un suport valoros pentru proiectarea moleculară rațională bazată pe structura țintei terapeutice a unor modulatori eficienți, dat fiind faptul că interacțiunea enzimă-ligand este condiționată de complementaritatea acestor elemente. În acest scop pot fi utilizate tehnicile *in silico* de andocare moleculară, care permit identificarea conformațiilor moleculare a unui ligand, favorabile din punct de vedere energetic pentru a interacționa cu enzima țintă

și a forma un complex stabil, precum și identificarea elementelor structurale care asigură o afinitate de legare favorabilă.

De asemenea, o metodă alternativă de proiectare moleculară rațională ce poate fi exploatată pentru dezvoltarea de noi medicamente antifungice este cea bazată pe descriptorii moleculari dovediți ca fiind relevanți pentru efectul terapeutic urmărit, obținuți din testarea *in silico/in vitro* a bazelor de compuși (liganzi) bioactivi.

Una din provocările procesului de obținere a moleculelor prototip (leader) este reprezentată de identificarea structurilor chimice care, pe lângă complementaritatea cu ținta terapeutică de interes, să aibă proprietăți fizico-chimice care să asigure o distribuție adecvată *in vivo*, rezistență la metabolizarea presistemică, și un profil de siguranță optim. Astfel, în procesul de optimizare a moleculelor leader, un rol deosebit de important îl au studiile *in silico* de predicție a parametrilor farmacocinetici (ADMET), respectiv studiile de evaluare a interacțiunii cu alte izoenzime ale CYP450 sau cu proteine transportoare plasmatică. În acest sens, este importantă determinarea precoce a unor proprietăți fizico-chimice precum logP, refracție molară, greutate moleculară, sau număr de donori/acceptori de legături de H.

Contribuție personală

Metodologie generală

Prin aplicarea principiilor de proiectare moleculară rațională a medicamentelor, au fost obținute 33 de noi molecule cu activitate anti-*Candida*. Compușii nou sintetizați au fost caracterizați din punct de vedere fizico-chimic, structurile chimice corespunzătoare fiind confirmate prin analiză elementală cantitativă de C, H, N și S, respectiv prin metode de analiză spectrală (FT-IR, ESI-MS, ¹H NMR and ¹³C NMR).

Pentru investigarea mecanismului de acțiune la nivel molecular al noilor compuși sintetizați s-au efectuat studii *in silico* de andocare moleculară, folosind ca enzimă țintă fiind lanosterol-C¹⁴α-demetilaza (CYP51). Programul AutoDock 4.2.6 a fost utilizat pentru identificarea conformațiilor moleculare favorabile, din punct de vedere energetic, pentru interacțiunea cu ținta celulară, folosind algoritmului genetic Lamarckian. Valorile energiei de legare (ΔG) au fost evaluate cu ajutorul unor funcții de scalare.

Activitatea anti-*Candida* a noilor compuși sintetizați a fost determinată *in vitro* prin metoda microdiluțiilor. Rezultatele obținute, în termeni de concentrație minimă inhibitorie (CMI), respectiv concentrație minimă fungicidă (CMF), au fost interpretate prin comparație cu valorile înregistrate pentru Fluconazol, folosit ca și antifungic de referință.

Studiul 1. Proiectarea moleculară rațională bazată pe structura țintei celulare a unor noi derivați 3-mercapto-1,2,4-triazolici-*N*⁴-substituiți ca potențiali agenți anti-*Candida*

Eficiența terapeutică remarcabilă și utilizarea pe scară largă a triazolilor antifungici autorizați clinic confirmă faptul că lanosterol-C¹⁴α-demetilaza (CYP51) fungică este o țintă terapeutică validată, ce se pretează a fi utilizată pentru dezvoltarea de noi chimioterapice antimicotice. Astfel, un prim obiectiv al cercetării doctorale a fost proiectarea moleculară rațională și sinteza chimică de noi derivați 1,2,4 triazolici ca potențiali inhibitori ai CYP51. În încercarea de a obține noi compuși cu un profil farmacotoxicologic îmbunătățit, și mai puțin susceptibili la mecanismele de rezistență dezvoltate de agenții patogeni, au fost efectuate o serie de modificări structurale care au avut ca scop reducerea afinității acestor compuși față de Fe²⁺ hemic din situsul catalitic al enzimei țintă, respectiv îmbunătățirea interacțiunii cu apoproteina.

Noii compuși cu structură 1,2,4-triazolică au fost sintetizați printr-o serie de reacții chimice, pornind de la timol. Prin reacția de *O*-alchilare a grupării hidroxil fenolice cu 2-bromoacetat de etil, urmată de hidrazinoliza esterului rezultat, s-a obținut un compus de tip hidrazidă, a cărui sinteză a fost anterior raportată în literatură. Ulterior, prin intermediul unei reacții de condensare a acestui intermediar cheie cu diferiți izotiocianați *N*-substituiți, s-au sintetizat trei compuși de tip acil-tiosemicarbazidă. Ciclizarea intramoleculară, în mediu bazic, a acestora, urmată de o reacție de *S*-alchilare cu compuși α-halocarbonilici, au permis obținerea, cu randamente bune, a trei serii de derivați 3-mercapto-1,2,4-triazolici-*N*⁴-substituiți.

Conform rezultatelor studiului *in silico* de andocare moleculară, triazolii nou-sintetizați au o afinitate mai crescută față de izoforma fungică a enzimei țintă, comparativ cu izoforma umană. În plus, acești compuși acționează ca inhibitori non-competitivi ai lanosterol-C¹⁴α-demetilazei, legarea de enzimă fiind mediată predominant de interacțiuni hidrofobe cu resturile de aminoacizi din canalul de acces către situsul catalitic, împiedicând astfel legarea și biotransformarea ulterioară a substratului fiziologic. Dat fiind faptul că interacțiunea cu CYP51 nu implică legarea covalent-coordinativă a Fe²⁺ hemic, acești compuși pot fi asociați cu un risc redus de a produce efecte secundare rezultate din cross-inhibiția altor izoenzime umane ale citocromului P450.

În ceea ce privește activitatea anti-*Candida in vitro* a noilor derivați triazolici, potența efectului antifungic al majorității compușilor testați a fost inferioară Fluconazolului. Totuși, pentru unul dintre aceștia, având un substituent alil atașat de atomul de *N* din poziția 4 a heterociclului triazolic, valoarea CMI determinată a fost egală cu cea obținută pentru antifungicul de referință. De asemenea, rezultatele testării microbiologice sugerează faptul că prezența unui nucleu fenil para-substituit cu un atom de clor, în poziția 3 a heterociclului triazolic, îmbunătățește activitatea inhibitorie a compușilor testați, atât pe tulpinile de *Candida albicans*, cât și pe cele non-*albicans*.

Studiul 2. Proiectarea moleculară rațională bazată pe liganzi a unor noi derivați 1,3-tiazolici- C^4 -substituiți ca potențiali agenți anti-*Candida*

Mecansimele de rezistență la chimioterapicele antimicotice dezvoltate de tulpinile de *Candida spp.* au un puternic impact negativ asupra eficienței terapeutice a azolilor antifungici autorizați clinic, dar și a moleculelor care nu fac parte din prima linie de tratament a candidozelor sistemice, cum sunt echinocandinele. Acest lucru subliniază nevoia acută pentru expansiunea cercetării și dezvoltării de noi antifungice, respectiv identificarea de noi structuri chimice cu potențial farmacofor. Astfel, un alt obiectiv al cercetării doctorale a fost proiectarea moleculară rațională bazată pe liganzi, sinteza chimică și prospectarea activității antifungice a unor noi derivați 1,3-tiazolici- C^4 -substituiți. Ținând cont de datele recent raportate în literatură cu privire la beneficiul adus de prezența unui substituent hidrazinil în poziția 2 a heterociclului azolic, a fost sintetizată o a doua serie de compuși 2-hidrazinil-1,3-tiazolici, păstrând identic substituentul aromatic din poziția 4.

Pentru sinteza chimică a primei serii de compuși, am pornit de la reacția de *O*-alchilare a grupării -OH fenolice a timolului cu 2-iodacetamida. Prin tionarea amidei astfel obținute, utilizând reactivul Lawesson, urmată de reacția clasică de condensare Hantzsch a tioamidei rezultate cu diferiți α -halocarbonili, s-au obținut derivații 1,3-tiazolici- C^4 -substituiți. Sinteza chimică a celei de-a doua serii de compuși are la bază reacția de *O*-alchilare cu 2-bromoacetofenonă, în mediu bazic, a timolului, care a dus la obținerea unui intermediar de tip cetonă. Printr-o reacție de condensare a acestuia cu tiosemicarbazidă, urmată de heterociclizarea iminei rezultate din acest proces, s-au obținut noi derivați 2-hidrazinil-1,3-tiazolici- C^4 -substituiți.

Rezultatele testării biologice a compușilor nou sintetizați, exprimate ca și CMI, respectiv CMF, sugerează faptul că prezența unui linker de tip hidrazonă în poziția 2 a heterociclului 1,3-tiazolic, în cazul celei de-a doua serii de compuși, crește potența efectului anti-*Candida* al acestora. O explicație în acest sens este data de lipofilia crescută a derivaților 2-hidrazinil-1,3-tiazolici, acest parametru fiind direct corelat cu abilitatea moleculelor de a traversa membrana celulară fungică. Pentru doi dintre acești compuși s-au înregistrat valori promițătoare ale CMI (7.81 $\mu\text{g/mL}$, respectiv 3.9 $\mu\text{g/mL}$), semnificativ mai reduse comparative cu valoarea obținută pentru antifungicul de referință (15.62 $\mu\text{g/mL}$). Diferențele în ceea ce privește potența antifungică a compușilor din cea de-a doua serie pot fi atribuite proprietăților sterice și electronice ale para-substituentului nucleului fenil din poziția 4 a heterociclului tiazolic. Datele obținute sugerează faptul că prezența unui substituent nepolar, cu efect inductiv donor de electroni (- CH_3), este corelată cu un efect inhibitor superior, comparativ cu grupările funcționale polare (-CN, - NO_2 , -OH), atât pe tulpinile de *C. albicans*, cât și pe cele non-*albicans*.

Încurajați de rezultatele promițătoare ale testării biologice, și ținând cont de natura azolică a compușilor nou-sintetizați, am presupus că aceștia pot să acționeze inhibitor la nivelul căii de biosinteză a ergosterolului fungic. Pentru a confirma ipoteza propusă, a fost efectuat un studiu *in silico* de andocare moleculară, folosind ca enzimă țintă lanosterol-C¹⁴α-demetilaza fungică. Pentru toți compușii testați au fost identificate conformații moleculare cu afinitate bună de legare față de CYP51, diferențele observate, în ceea ce privește valorile energiei de legare, fiind corelate, și în acest caz, cu lipofilia și efectele electronice ale para-substituentului nucleului fenil din poziția 4 a heterociclului tiazolic. Important de menționat este că, spre deosebire de azolii antifungici autorizați clinic, efectul inhibitor enzimatic al compușilor testați nu este datorat legării covalent-coordinative a Fe²⁺ din situsul catalitic al CYP51, ci interacțiunilor hidrofobe cu canalul de acces către situsul activ și împiedicarea legării, respectiv biotransformării substratului fiziologic.

Studiul 3. Studiul relației structură chimică-activitate biologică a derivaților tiazolici C⁴-substituiți. Sinteza și prospectarea activității antifungice a unor noi molecule cu un profil structural optimizat

Pornind de la datele obținute din studiul relației structură chimică-activitate biologică a moleculelor anterior sintetizate, ne-am propus dezvoltarea și evaluarea potențialului antifungic a două noi serii de astfel de compuși 1,3-tiazolici, respectiv 2-hidrazinil-1,3-tiazolici, având în poziția 4 un radical fenil para-substituit cu o grupare funcțională electronodonoare (-O-CH₃, -Cl and -Br). Pentru sinteza chimică a noilor compuși am folosit protocolul experimental anterior descris.

De asemenea, un obiectiv secundar al acestui studiu a fost investigarea relației dintre lipofilia, respectiv caracterul aromatic al substituentului anterior menționat, și magnitudinea efectului antifungic. Astfel, am sintetizat câte un nou compus din fiecare serie, având în poziția 4 un radical naftil.

Rezultatele testării biologice a noilor molecule au confirmat ipoteza inițială, compușii cei mai activi fiind cei trei derivați 2-hidrazinil-1,3-tiazolici având în poziția 4 un nucleu fenil para-substituit. Pentru aceștia, valorile CMI pe tulpinile de *Candida albicans* (3.9 μg/mL) au fost de 4 ori mai mici comparativ cu valoarea înregistrată pentru antifungicul de referință (15.62 μg/mL).

Datele obținute din studiul de andocare moleculară sugerează faptul că, la fel ca și în cazul primelor serii sintetizate, noii compuși tiazolici pot acționa ca inhibitori non-competitivi ai lanosterol-C¹⁴α-demetilazei fungice, afinitatea față de enzima țintă fiind influențată de polaritatea, respectiv proprietățile sterice și electronice ale acestora.

În continuare, ne-am propus investigarea *in vitro* a mecanismului de acțiune sugerat de aceste studii *in silico*. Astfel, a fost analizat, prin microscopie de fluorescență, efectul de permeabilizare a membranei celulare indusă de derivații tiazolici nou-sintetizați, folosind ca marker iodura de propidiu (PI). Am ales acest

colorant, care prezintă emisie fluorescentă la excitarea cu o radiație electromagnetică din domeniul UV-VIS, deoarece este un compus incapabil să penetreze prin membrana celulară intactă, ceea ce permite marcarea fluorescentă diferențială a celulelor fungice a căror integritate membranară a fost compromisă.

Pentru analiza spectrofluorimetrică s-a folosit o suspensie de celule de *C. albicans* într-o soluție sterilă de tampon fosfat, care a fost incubată, în condiții similare celor fiziologice, în prezența compusului tiazolic pentru care s-au obținut cele mai bune rezultate la evaluarea activității antifungice, atât *in vitro*, cât și *in silico*, compus adăugat într-o concentrație egală cu CMI. Ulterior, celulele fungice au fost marcate cu iodură de propidiu (IP) și analizate la microscopul inversat cu fluorescență. Interpretarea rezultatelor s-a făcut prin comparație cu cele înregistrate pentru celulele fungice din lotul control, care au fost tratate în aceleași condiții, în absența compusului testat. Imaginile obținute evidențiază fluorescența roșie a celulelor de *C. albicans* din lotul test, ceea ce indică internalizarea iodurii de propidiu. Emisia fluorescentă a IP nu a fost evidențiată în cazul celulelor fungice din lotul control. Datele obținute sugerează faptul că efectul fungicid al noilor compuși tiazolici sintetizați poate fi datorat alterării integrității structurale a membrane celulare fungice, care poate fi o consecință a efectului inhibitor la nivelul căii de biosinteză a ergosterolului.

Studiul 4. Analiza profilului farmacocinetic și a proprietăților fizico-chimice direct corelate cu activitatea terapeutică a derivaților 1,3-tiazolici anterior sintetizați

Date fiind rezultatele promițătoare obținute la evaluarea activității antifungice a compușilor cu structură 1,3-tiazolică anterior prezentați, ne-am propus investigarea, printr-un studiu ADMET *in silico*, a proprietăților farmacocinetice și drug-like ale acestora. În acest scop, a fost utilizată platforma web SwissADME. De asemenea, pentru a obține date suplimentare legate de distribuția *in vivo* a acestor molecule, a fost evaluată legarea acestora de albumina serică. Din considerente de cost, și datorită gradului ridicat de similitudine cu proteina transportoare umană, pentru determinările experimentale a fost utilizată izoforma bovină a albuminei (BSA). Afinitatea de legare, respectiv mecanismul de interacțiune cu BSA, au fost analizate prin spectroscopie de fluorescență, în condiții experimentale similare celor fiziologice.

Rezultatele studiului *in silico* ADMET indică faptul că derivații tiazolici testați îndeplinesc criteriile ce condiționează o biodisponibilitate adecvată la administrare orală. De asemenea, datele obținute sugerează un potențial avantaj față de azolii antifungici autorizați clinic în ceea ce privește susceptibilitatea noilor compuși pentru interacțiuni medicamentoase, dat fiind faptul că majoritatea moleculelor care au prezentat o activitate biologică promițătoare nu induc cross-inhibiția izoformei umane CYP2C9.

Rezultatele studiului de legare de BSA indică o dependență liniară a intensității emisiei fluorescente a proteinei de concentrația compușilor tiazolici testați. În acest caz, stingerea fluorescenței BSA este datorată unei interacțiuni statice, în stare neexcitată, proteină-ligand, cu formarea unui complex nefluorescent. Pentru majoritatea compușilor testați, nu a fost înregistrată o deplasare a maximului de emisie fluorescentă, ceea ce sugerează faptul că aceștia nu afectează structura terțiară a BSA. Parametrii calculați cu ajutorul ecuației clasice Stern-Volmer (K_{sv}) indică faptul că magnitudinea efectului de stingere a fluorescenței este dependentă de polaritatea și proprietățile sterice ale moleculelor testate. Valorile constantei de afinitate K_b obținute pentru majoritatea compușilor testați sugerează o interacțiune moderată și reversibilă a acestora cu BSA, ceea ce poate influența pozitiv distribuția *in vivo*, respectiv atingerea unei concentrații plasmatiche eficiente terapeutic.

Concluzii generale

Incidența tot mai crescută a infecțiilor fungice invazive cauzate de tulpini multirezistente din genul *Candida* reprezintă o problemă de sănătate publică majoră, ceea ce subliniază importanța investiției în cercetarea și dezvoltarea de noi alternative terapeutice.

Pornind de la această nevoie pentru noi medicamente antifungice eficiente, și ținând cont de datele raportate în literatura de specialitate privind direcțiile de cercetare actuale în domeniu, cercetarea doctorală a avut ca obiectiv sinteza chimică și prospectarea activității anti-*Candida* a unor noi compuși heterociclici azolici. Pentru proiectarea moleculară a acestor compuși au fost utilizate strategiile computaționale de design rațional bazat pe structura tridimensională a țintei terapeutice (SBDD), respectiv pe liganzi bioactivi (LBDD).

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

În cadrul cercetării doctorale, prin aplicarea strategiei de proiectare moleculară bazată structura țintei terapeutice (SBDD), au fost sintetizați 15 noi derivați 3-mercapto-1,2,4-triazolici- N^4 -substituiți ca potențiali inhibitori ai lanosterol- $C^{14}\alpha$ -demetilazei (CYP51). Studiul *in silico* de andocare moleculară efectuat sugerează faptul că acești compuși, spre deosebire de triazolii antifungici autorizați clinic, acționează ca inhibitori non-competitivi ai enzimei țintă, ceea ce oferă un avantaj în ceea ce privește profilul de siguranță.

De asemenea, prin aplicarea strategiei de proiectare moleculară rațională bazată pe liganzi (LBDD), au fost sintetizați 18 noi derivați 1,3-tiazolici- C^4 -substituiți. Analiza relației structură chimică-activitate biologică efectuată pentru seriile obținute inițial au permis identificarea elementelor structurale direct corelate cu magnitudinea efectului terapeutic, ceea ce a permis sinteza chimică de noi molecule având o potență

antifungică îmbunătățită. Patru dintre derivații 1,3-tiazolici nou sintetizați au prezentat o activitate anti-*Candida in vitro* superioară antifungicului de referință, conform valorilor CMI/CMF înregistrate. În plus, studiile *in silico* de andocare moleculară efectuate, respectiv analiza prin microscopie de fluorescență a celulelor fungice, sugerează faptul că acești compuși acționează inhibitor la nivelul căii de biosinteză a ergosterolului. Faptul că ținta terapeutică a noilor compuși sintetizați este una validată, pentru care există inhibitori autorizați clinic, încurajează optimizarea acestora prin derivatizare chimică, cu scopul obținerii de noi molecule prototip (leader). Primul pas făcut în această direcție, în cadrul cercetării doctorale, a fost evaluarea preliminară a proprietăților farmacocinetice și drug-like a acestor compuși. Datele obținute indică faptul că aceste molecule se pretează pentru optimizarea și dezvoltarea ulterioară ca substanțe active cu administrare orală.

Rezultatele cercetării doctorale pot fi utilizate pentru a răspunde la două cerințe importante ale industriei farmaceutice, și anume dezvoltarea de noi chimioterapice antifungice, prin identificarea de structuri chimice cu potential farmacofor, respectiv obținerea de noi agenți terapeutici cu biodisponibilitate adecvată la administrare orală.

ABSTRACT OF THE PhD THESIS

Chemical and pharmacological development of novel bioactive aryl-oxymethyl-azole derivatives

PhD student **Andreea-Iulia Pricopie**

PhD supervisor **Prof. Ovidiu Oniga, PhD**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
STATE OF THE ART	
1. Opportunistic fungal infections. Current pharmacotherapy approaches and future perspectives	19
1.1. Epidemiology and disease burden	19
1.2. Pharmacotherapy – limitations and future prospects	20
1.2.1. An insight on fungal pathogenicity	20
1.2.2. Current antifungal arsenal and impact of cellular stress response on fungal resistance to treatment	21
1.2.2.1. Resistance to polyenes	22
1.2.2.2. Resistance to azoles	22
1.2.2.3. Resistance to echinocandins	24
1.2.2.4. Resistance to 5-flucytosine	24
2. Addressing the clinical need for novel antifungals. Drug research and development	25
2.1. An overview of the rational drug design process	26
2.1.1. Drug target. Druggability	27
2.2. Structure-based drug design (SBDD)	28
2.3. Ligand-based drug design (LBDD)	30
3. Targeted antifungal drug development	31
3.1. Novel molecular targets for antifungal drug development	31
3.1.1. Trehalose signaling pathway	32
3.1.2. Sphingolipids biosynthetic pathway	33
3.1.3. Calcineurin signaling pathway	34
3.2. Development of novel antifungal agents directed against validated molecular targets	36
3.2.1. Ergosterol and its biosynthetic pathway	36

3.2.2. The fungal cell wall	38
3.2.2.1. Chitin synthase	38
3.2.2.2. 1,3- β -glucan synthase	39
3.3. Therapeutic alternatives	40
3.3.1. Immunotherapy	40
3.3.1. Drug repurposing	41

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Main objectives/Work hypothesis	45
2. General methodology	49
3. Study 1. Structure-based drug design and synthesis of some novel N⁴-substituted-1,2,4-triazol-3-yl-mercapto derivatives as potential anti-<i>Candida</i> agents	53
3.1. Introduction	53
3.2. Main objectives/Work hypothesis	54
3.3. Materials and methods	54
3.3.1. Chemistry	55
3.3.2. Molecular docking study	57
3.3.3. <i>In vitro</i> antifungal assay	57
3.4. Results and discussion	57
3.4.1. Chemistry	57
3.4.2. Molecular docking study	65
3.4.3. <i>In vitro</i> antifungal assay	68
3.5. Conclusions	70
4. Study 2. Ligand-based drug design and synthesis of novel 1,3-thiazole and 2-hydrazinyl-1,3-thiazole derivatives as potential antifungal agents: <i>in silico</i>/<i>in vitro</i> anti-<i>Candida</i> screening	71
4.1. Introduction	71
4.2. Main objectives/Work hypothesis	72
4.3. Materials and methods	73
4.3.1. Chemistry	73
4.3.2. <i>In vitro</i> antifungal assay	76
4.3.3. <i>In silico</i> investigation of the molecular mechanism of action	76
4.4. Results and discussion	76
4.4.1. Chemistry	76
4.4.2. <i>In vitro</i> antifungal assay	82
4.4.3. <i>In silico</i> investigation of the molecular mechanism of action	83
4.5. Conclusions	85
5. Study3. SAR analysis - based design and development of novel	87

2,4-disubstituted-1,3-thiazole derivatives as anti-Candida agents.

Investigation of the molecular mechanism of action

5.1. Introduction	87
5.2. Main objectives/Work hypothesis	88
5.3. Materials and methods	90
5.3.1. Chemistry	90
5.3.2. <i>In vitro</i> antifungal assay	91
5.3.3. Molecular docking study	91
5.3.4. Propidium iodide (PI) dye uptake assay	91
5.4. Results and discussion	92
5.4.1. Chemistry	92
5.4.2. <i>In vitro</i> antifungal assay	95
5.4.3. Molecular docking study	96
5.4.4. Propidium iodide (PI) dye uptake assay	98
5.5. Conclusions	99

6. Study 4. Evaluation of the pharmacokinetic properties and drug-likeness of the newly synthesized thiazole antifungals. *In silico* ADMET prediction study and spectroscopic investigation of their binding interaction with serum albumine

6.1. Introduction	101
6.2. Main objectives/Work hypothesis	102
6.3. Materials and methods	103
6.3.1. ADMET profiling	103
6.3.2. Serum albumine-binding study	103
6.4. Results and discussion	104
6.4.1. ADMET profiling	104
6.4.2. Serum albumine-binding study	107
6.5. Conclusions	112

7. General conclusions

8. Thesis originality and innovative contributions

REFERENCES

Keywords: *Candida albicans*, rational drug design, ergosterol, cell membrane disruption, molecular docking, spectrofluorimetry

Introduction

The alarming increase of the *Candida spp.*-based nosocomial infectious diseases, in the context of the reduced number of available antimycotic chemotherapeutics, and the emergence of robust resistance mechanisms developed by the fungal strains, outlines the pressing need for the drug design and development of novel antifungals.

The doctoral research focused on the rational design and development of novel synthetic azole derivatives as potential anti-*Candida* agents. The synthesized chemical scaffolds were chosen according to basic rational design concepts, targeting validated, fungal-specific molecular targets.

State of the art

Concerning the rational design of novel antimycotic chemotherapeutics, morphological and metabolic similarities between fungal and mammalian eukaryotic cells represent an important barrier for the identification of a biological target that is unique to the microbial pathogens. The extensive knowledge in the field of molecular biology and pathogenesis, as well as the advent of genomic technologies, allowed the identification of metabolic pathways which can be successfully employed as molecular targets for the rational design and development of selective antifungal agents. However, translating the discoveries from bench to bedside is a long process and most of the potential lead molecules fail to reach the patients. Thus, cellular structures and functions that have already been successfully targeted by drugs in clinical use should be in focus, as these have the advantage of being "field-tested" and the chemicals targeting them are in all likelihood to be effective antifungals.

The substantial therapeutic success achieved by the antifungal drugs belonging to azoles and polyenes classes have been made the fungal ergosterol and its biosynthetic pathway, especially the later step catalyzed by the enzyme lanosterol-C¹⁴α-demethylase (CYP51), a hemoprotein belonging to cytochrome P450 superfamily, a highly promising target for the development of novel therapeutic approaches. The availability of the CYP51 three-dimensional structure enables a diligent inspection of the binding site topology, including the presence of clefts, cavities and sub-pockets. This represents a valuable support for the structure-based rational design of efficient modulators, since ligand-target interactions are mediated by their complementarity. Docking simulation is an widely used *in silico* drug-design tool, which allows the prediction of the preferred molecular orientation of a ligand within a target biomacromolecule when bound to each other to form a stable complex, as well as the identification of structural features necessary for efficient binding interaction.

Additionally, ligand-based drug design approaches facilitate the development of antimycotic chemotherapeutics based on the molecular descriptors which were certified as being relevant for the targeted therapeutical activity, gathered from the screening of large libraries of bioactive compounds.

One of the challenges faced in the process of lead generation is to identify chemical compounds that not only exhibit a high binding affinity towards the desired target protein, but also have adequate physical properties to reach systemic circulation, to resist metabolic inactivation for a specific period of time and to avoid off-target side effects. Thus, a paramount in lead optimization is represented by the *in silico* prediction of its potential interaction with ADMET- relevant off-targets, such as the metabolic CYP450 enzymes, or drug transporters, such as serum albumin. In this setting, there are other molecular properties needed to be determined, such as logP, molar refractivity, number of hydrogen bond donors/acceptors and molecular weight.

Personal contribution

General methodology

By applying principles of rational drug design, we developed 33 new molecules endowed with anti-*Candida* activity. The newly synthesized compounds were fully characterized by their physico-chemical properties, and the corresponding chemical structures were confirmed by elemental analysis and spectral data (FT-IR, ESI-MS, ¹H NMR and ¹³C NMR).

Molecular docking studies were performed in order to investigate the molecular mechanism of action of the newly synthesized compounds, using lanosterol-C¹⁴α-demethylase (CYP51) as target enzyme. AutoDock 4.2.6 was employed for the identification of the most likely binding conformation, corresponding to a solution of minimum energy, using the Lamarckian genetic algorithm. The binding energy (ΔG) of possible ligands poses were evaluated through a grid-based method.

The *in vitro* anti-*Candida* activity of the newly synthesized compounds was evaluated through the validated broth microdilution method. The obtained results, in terms of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC), were compared to the values obtained for fluconazole, used as the reference antifungal.

Study 1. Structure-based drug design and synthesis of some novel N⁴-substituted-1,2,4-triazol-3-yl-mercapto derivatives as potential anti-*Candida* agents

On account of the valuable potential of the fungal lanosterol-C¹⁴α-demethylase (CYP51) as a validated molecular target for the structure-based drug design and development of novel antimycotic chemotherapeutics, which is supported by the

therapeutical efficiency and extensive clinical use of the marketed triazole antifungals, we aimed to synthesize novel series of 1,2,4-triazole derivatives targeting this heme-containing enzyme. The major goal of this research study is to obtain novel synthetic bioactive molecules having a reduced mammalian toxicity and less susceptible to the adaptive strategies developed by the fungal strains in order to break out the cytotoxic effect of the antifungal treatment. Thus, the applied rational design strategy focused on the development of a chemical scaffold endowed with a lower heme-Fe²⁺ affinity and improved binding interaction with the apoprotein of the target enzyme.

The chemical synthesis of the titled compounds was carried out through a multi-step reaction protocol, starting with an *O*-alkylation reaction of thymol with ethyl bromoacetate. The hydrazinolysis of the obtained ester allowed the synthesis of a hydrazide compound, which was previously reported in the literature. Further condensation of this intermediate with various *N*-substituted isothiocyanates, followed by intramolecular cyclization, in basic media, of the corresponding *N*-substituted acylthiosemicarbazide derivatives and the *S*-alkylation reaction, with different α -haloketones, yielded the desired triazole derivatives.

The results of the performed molecular docking study showed that the tested compounds possess a weaker binding affinity towards the human CYP51, compared to the fungal homologous, so they might be associated with a reduced mammalian toxicity. Moreover, the fungal CYP51 inhibition was mediated mainly by non-covalent interactions with the amino acid residues from the access channel to the active site, thus limiting the binding and subsequent transformation of the physiological fungal sterol substrate. Since these novel molecules do not interact with the catalytic site of the target enzyme through the covalent-coordination of the heme Fe²⁺, mammalian toxicity raised from the cross-over inhibition of the off-target human CYP450 isoforms might be avoided.

With respect to the *in vitro* anti-*Candida* screening, the antifungal potency of the majority of the newly synthesized triazole derivatives proved to be inferior to that of fluconazole. However, the MIC value registered for one of the tested compounds, having an *N*⁴-allyl-substituent, was equal to that of the reference antifungal. Moreover, it seems that the presence of a halogenated aryl substituent attached to the *C*³ position of the 1,2,4-triazole heterocycle proved to be favorable for the inhibitory activity on both *albicans* and non-*albicans Candida* strains.

Study 2. Ligand-based drug design and synthesis of novel 1,3-thiazole and 2-hydrazinyl-1,3-thiazole derivatives as potential antifungal agents: *in silico/in vitro* anti-*Candida* screening

The emergence of acquired resistance among pathogenic *Candida* strains has a strong negative impact on the therapeutic efficiency of both clinically approved azole antifungals and the drugs used as salvage therapy, such as echinocandins. Thus, it is

outlined the imperative need for the expansion of the antifungal pipeline and identification of other drug-like chemical structures as key pharmacophores. In this setting, we focused on the rational ligand-based drug design and synthesis of a novel series of *C*⁴-substituted-1,3-thiazole derivatives as potential antifungal agents. On account of the recently reported data regarding the importance of a hydrazine substituent at the *C*² position of the thiazole ring in terms of improved anti-*Candida* activity, we obtained a second series of substituted-2-hydrazinyl-1,3-thiazole derivatives, having the same *C*⁴-aromatic moiety.

The organic synthesis of the first series of compounds started with an *O*-alkylation reaction of the phenolic hydroxyl group of thymol with 2-iodoacetamide. The thionation process of the obtained amide compound, using Lawesson reagent (LR), followed by the Hantzsch condensation of the intermediate thioamide with the appropriate α -haloketones, afforded the targeted 4-substituted-1,3-thiazole derivatives. The desired 2-hydrazinyl-4-phenyl-1,3-thiazoles were synthesized by reacting thymol with 2-bromoacetophenone in alkaline media, followed by the classical condensation of the resulting ketone with thiosemicarbazide and heterocyclization of the intermediate imine compound with the corresponding α -haloketones.

The 2-hydrazinyl-4-substituted-1,3-thiazole derivatives proved to be superior to those lacking the *C*²-hydrazone linkage in terms of antifungal potency, as supported by the recorded MIC/MFC values. This superiority may be explained by the increased lipophilicity of the former, which correlates with an increased ability to penetrate the fungal cell membrane. Two compounds exhibited promising results, their corresponding MIC values (7.81 $\mu\text{g/mL}$ and 3.9 $\mu\text{g/mL}$, respectively) being substantially lower than the value recorded for fluconazole (15.62 $\mu\text{g/mL}$), used as the reference antifungal. Some structure-dependent differences in activity could be noticed in this series, which were related to the para-substitution of the *C*⁴-phenyl ring. It seems that the presence of a lipophilic, electron-donating substituent ($-\text{CH}_3$) is correlated with an increased inhibitory activity on both *albicans* and non-*albicans Candida* strains, as compared with hydrophilic, polar substituents ($-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{OH}$).

On account of the promising *in vitro* antifungal activity, and taking into consideration the azole nature of these molecules, we speculate that the newly synthesized compounds might act through altering the ergosterol biosynthetic pathway. Aiming to investigate this hypothesis, a molecular docking study was carried out on *Candida albicans* lanosterol-*C*¹⁴ α -demethylase (CYP51). All the tested molecules demonstrated a good binding affinity toward the target enzyme, the observed differences in terms of binding energy for compounds from both series being attributed to the lipophilicity and mesomeric effects of the para-substituent of the *C*⁴-phenyl ring. The induced enzyme inhibition is not related to the covalent coordination of the heme Fe^{2+} , as in the case of classical antifungal azoles, but they compete with the physiological substrate of the CYP51 for the access channel to the active site.

Study 3. SAR-analysis based design and development of novel 2,4-disubstituted-1,3-thiazole derivatives as anti-*Candida* agents. Investigation of the molecular mechanism of action

Based on the data obtained from the structure-activity relationship study of the previously synthesized compounds, we decided to develop and evaluate the antifungal potential of novel analogous molecules, keeping constant the key pharmacophores, 1,3-thiazole and 2-hydrazinyl-1,3-thiazole, and introducing different lipophilic, π -donor moieties (-O-CH₃, -Cl and -Br) at the C⁴-position of the thiazole heterocycle. For this purpose, was employed the synthetic protocols described above. Additionally, we aimed to investigate how the increase of the hydrophobicity and aromaticity of the C⁴-substituent of the thiazole heterocycle influence the antifungal activity. Thus, we synthesized two compounds bearing a C⁴-naphthalene ring.

2-Hydrazinyl-thiazole derivatives having a lipophilic (+ π) para-substituent in the C⁴ position of the azole heterocycle were the most promising, exhibiting MIC values (3.9 μ g/mL) that were four times lower when compared to the reference drug fluconazole (15.62 μ g/mL) against the pathogenic *Candida albicans* strain. These findings are in accordance with the results obtained in our previous study. However, the alteration in the size of the ring system, through the replacement of the C⁴-para-substituted-phenyl ring with a naphthyl moiety, led to a decrease in the inhibitory activity on both *albicans* and non-*albicans* strains.

The results of the performed molecular docking study suggested that the tested compounds might act as non-competitive inhibitors of the target enzyme, the differences in the predicted binding mode and ligand-protein affinity being linked to their electronic, steric, and hydrophobic properties.

Aiming to further investigate the proposed molecular mechanism of action, was analysed the effect of the novel thiazole compounds on fungal cell membrane structural integrity. In this setting, a fluorescence microscopy study was performed, using propidium iodide (PI) as a tracer. This DNA-staining dye, which gives a red fluorescence when excited by an UV-VIS radiation, is the most frequently used fluorescence indicator for cell viability based on the membrane permeability, as it only stains cells with irreparably damaged membranes.

A previously reported experimental protocol was used for the spectrofluorimetric analysis. Thus, *Candida albicans* cells suspension in sterile phosphate buffered saline were incubated, under simulated physiological conditions, in the presence of MIC concentration of a newly synthesized 2-hydrazinyl-1,3-thiazole derivative, selected as the most active compound in both *in vitro* and *in silico* antifungal assays. Then, the PI was added and the fungal cells were analysed with an inverted fluorescence microscope. The captured red fluorescence signal indicates the cellular uptake of the fluorescent dye. No fluorescence was observed in the control cells, which were

incubated with PI alone. The obtained results suggest that fungicidal effect of the tested compound might be a consequence of the disruption of the fungal cell membrane structural integrity, resulting from the inhibition of the ergosterol biosynthesis.

Study 4. Evaluation of the pharmacokinetic properties and drug-likeness of the newly synthesized thiazole antifungals. *In silico* ADMET prediction study and spectroscopic investigation of their binding interaction with serum albumine

Encouraged by the results obtained from both *in silico* and *in vitro* antifungal screening of the newly synthesized thiazole derivatives (Studies 2 and 3), we aimed to assess their drug-like properties through an *in silico* ADMET study, using the freely accessible SwissADME web tool. Additionally, in order to get more insight into the *in vivo* distribution and pharmacokinetics of the titled compounds, their binding interaction with serum albumin, under simulated physiological conditions, was analysed through fluorescence spectroscopic titration. Given the high structural homology with HSA, and its relatively low cost, bovine serum albumin (BSA) was employed for this purpose.

According to the *in silico* ADMET prediction study, the tested compounds showed an acceptable gastrointestinal absorption, which supports their suitability for further development as orally active drugs. Moreover, in contrast to the clinically approved antifungal drug fluconazole, the majority of the 2-hydrazinyl-4-phenyl-1,3-thiazole derivatives exhibited no cross-inhibition of the human CYP2C9 isoenzyme, thus being less susceptible for drug–drug interactions-mediated side effects.

As shown by the data obtained from the protein-binding study, the novel thiazole derivatives can effectively quench the endogenous fluorescence of BSA by a static quenching mechanism, through the formation of a ground-state complex. For the large majority of the tested ligands, no shift of the maximum emission wavelength was observed, suggesting that these compounds do not induce obvious changes in the tertiary structure of the biomacromolecule. According to the calculated quenching constant values (K_{sv}), using the classical Stern-Volmer equation, the strength of the binding interaction is positively correlated with the polarity and steric effects of the tested molecules. A reversible and moderate interaction in BSA-ligand complex, which is associated with a faster diffusion rate *in vivo* to reach the target site, was exerted for the majority of the compounds, as indicated by the obtained K_b values.

General conclusions

The worrisome threat to the healthcare system represented by the global outbreak of invasive fungal infections caused by multi-drug resistant *Candida spp.*

highlights the importance of pursuing sustained research to develop better targeted therapeutic alternatives. Prompted by this imperative need for novel antifungals, and considering the literature reported data in the field, we focused on the rational design and chemical development of novel azole heterocyclic compounds as potential anti-*Candida* drugs. *In silico* computational techniques, both structure-based and ligand-based, were employed for this purpose.

Thesis originality and innovative contributions

15 novel *N*⁴-substituted-1,2,4-triazolyl-3-mercapto derivatives, as potential inhibitors of the fungal lanosterol-C¹⁴α-demethylase (CYP51), were obtained through a rational structure-based drug design methodology. Worth mentioning here is the different molecular mechanism of action of these compounds, as compared with the clinically approved triazole antifungals, which enables their further development as selective antimycotic drugs, with improved safety profile.

Additionally, 18 novel 2,4-disubstituted-1,3-thiazole compounds endowed with anti-*Candida* activity were developed by means of a ligand-based drug design strategy. The use of qualitative SAR analysis allowed the identification of structural features associated with a more potent inhibitory activity on the microbial pathogens, thus enabling the optimization of the initial scaffold and synthesis of compounds with improved antifungal potency. Four molecules exerted an *in vitro* anti-*Candida* activity substantially more potent, as compared with the marketed antifungal fluconazole, used as the reference drug. Moreover, the performed molecular docking and fluorescence microscopy analysis suggested that the synthesized thiazoles target the fungal ergosterol biosynthetic pathway, a validated drug target, thus encouraging their further development as lead-like molecules. An essential progress made in order to achieve this goal, is represented by the preliminary evaluation of compounds pharmacokinetics and drug-likeness. The obtained data indicates their suitability for further development as orally active drugs.

The data presented in this doctoral thesis might be a helpful support in order to address two important requests of the pharmaceutical industry: the clinical need to add on to the currently antifungal pipeline, through the identification of novel bioactive chemical scaffolds, and the commercial pressure for the development of small-molecules with adequate oral bioavailability.