
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Contribuții la sinteza și prospectarea activității biologice a unor compuși 1,4-fenilen-bistiazolici

Doctorand **Anca-Maria Borcea**

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. Considerații generale asupra sintezei și activității biologice a tiazolilor	19
1.1. Structura tiazolului	20
1.2. Metode de obținere a derivaților tiazolici	21
1.2.1. Sinteza Hantzsch	21
1.2.2. Sinteza Gabriel	21
1.2.3. Sinteza Cook-Heilbron	22
1.2.4. Reacția izonitrililor cu metilen activ cu carboditioați de metil	22
1.2.5. Reacția de alchilare-ciclizare dintre bromura de propargil substituită și tiouree	23
1.2.6. Obținerea tiazolilor pornind de la oxime, anhidride și tiocianat de potasiu	24
1.2.7. Obținerea tiazolilor pornind de la amine, aldehide și sulf elementar	24
1.2.8. Obținerea tiazolilor pornind de la vinil-azide și tiocianat de potasiu	25
1.3. Activitatea biologică a tiazolilor	26
1.3.1. Activitatea antimicrobiană	26
1.3.2. Activitatea antiprotozoarică	28
1.3.3. Activitatea antitumorală	30
1.3.4. Alte activități biologice	32
2. Considerații generale asupra sintezei și activității biologice a bistiazolilor	33
2.1. Metode de obținere a compușilor bistiazolici (tiazolil-tiazoli și tiazolil-linker-tiazoli)	33
2.1.1. Sinteza compușilor bistiazolici de tipul tiazolil-tiazoli	33
2.1.2. Sinteza compușilor bistiazolici de tipul tiazolil-linker-tiazoli	36
2.2. Activitatea biologică a derivaților bistiazolici	38

2.2.1. Activitatea antimicrobiană	38
2.2.2. Activitatea antiprotozoarică	40
2.2.3. Activitatea antitumorală	41
2.2.4. Alte activități biologice	43

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Ipoteza de lucru. Obiective	47
2. Metodologie generală	51
3. Studiul 1 - Sinteza chimică și evaluarea activității anti-Candida <i>in silico</i> și <i>in vitro</i> a unor noi compuși 1,4-fenilen-bistiazolici	55
3.1. Introducere	55
3.2. Ipoteza de lucru	57
3.3. Material și metodă	57
3.3.1. Sinteza chimică și analiza structurală	57
3.3.2. Studiul de andocare moleculară	59
3.3.3. Evaluarea proprietăților ADMET <i>in silico</i>	59
3.3.4. Evaluarea activității anti-Candida <i>in vitro</i>	59
3.4. Rezultate și discuții	60
3.4.1. Sinteza chimică și analiza structurală	60
3.4.2. Studiul de andocare moleculară	63
3.4.3. Evaluarea proprietăților ADMET <i>in silico</i>	65
3.4.4. Evaluarea activității anti-Candida <i>in vitro</i>	68
3.5. Concluzii	69
4. Studiul 2 - Sinteza chimică și evaluarea activității anti-Candida <i>in silico</i> și <i>in vitro</i> a unor derivați eterici 1,4-fenilen-bistiazolici	71
4.1. Introducere	71
4.2. Ipoteza de lucru	72
4.3. Material și metodă	72
4.3.1. Sinteza chimică și analiza structurală	72
4.3.2. Studiul de andocare moleculară	73
4.3.3. Evaluarea proprietăților ADMET <i>in silico</i>	74
4.3.4. Evaluarea activității anti-Candida <i>in vitro</i>	74
4.4. Rezultate și discuții	74
4.4.1. Sinteza chimică și analiza structurală	74
4.4.2. Studiul de andocare moleculară	77
4.4.3. Evaluarea proprietăților ADMET <i>in silico</i>	79
4.4.4. Evaluarea activității anti-Candida <i>in vitro</i>	81
4.5. Concluzii	82

5. Studiul 3 – Sinteza chimică și evaluarea activității anti-Candida <i>in vitro</i> și <i>in silico</i> a unei noi serii de acilhidrazone 1,4-fenilen-bistiazolice	83
5.1. Introducere	83
5.2. Ipoteza de lucru	84
5.3. Material și metodă	85
5.3.1. Sinteza chimică și analiza structurală	85
5.3.2. Evaluarea activității anti-Candida <i>in vitro</i>	86
5.3.3. Studiul de andocare moleculară	87
5.3.4. Evaluarea proprietăților ADMET <i>in silico</i>	87
5.4. Rezultate și discuții	87
5.4.1. Sinteza chimică și analiza structurală	87
5.4.2. Evaluarea activității anti-Candida <i>in vitro</i>	92
5.4.3. Studiul de andocare moleculară	94
5.4.4. Evaluarea proprietăților ADMET <i>in silico</i>	96
5.5. Concluzii	98
6. Studiul 4 - Evaluarea lipofiliei derivaților 1,4-fenilen-bistiazolici prin metode teoretice și experimentale	99
6.1. Introducere	99
6.2. Ipoteza de lucru	100
6.3. Material și metodă	101
6.4. Rezultate și discuții	103
6.5. Concluzii	114
7. Concluzii generale	115
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	119
REFERINȚE	121

Cuvinte cheie: 1,4-fenilen-bistiazoli, sinteză chimică, anti-Candida, andocare moleculară, ADMET, lipofilie

INTRODUCERE

Infecțiile fungice au devenit una dintre cauzele principale de mortalitate și morbiditate în cazul pacienților imunocompromiși. Creșterea numărului de infecții fungice invazive se datorează creșterii numărului de pacienți cu anumite afecțiuni sau factori de risc asociați, dintre care amintim: infecția cu HIV, imunodeficiența primară, transplantul hematologic sau de organ, prematuritatea, chimioterapia și terapia cu agenți imunomodulatori.

Opțiunile terapeutice actuale sunt limitate la câteva clase de medicamente care sunt frecvent asociate cu fenomenul de rezistență intrinsecă sau dobândită, prezintă o toxicitate destul de ridicată și sunt costisitoare.

În acest context, dezvoltarea de noi compuși cu activitate antifungică, care să se caracterizeze printr-o selectivitate ridicată la nivelul celulei fungice, prin absența toxicității *off-target* și care să acționeze printr-un mecanism nou și/sau să prezinte alte situsuri de legare la nivelul țintelor validate, reprezintă o prioritate a cercetării din domeniul chimiei medicamentului.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Compușii heterociclici cu azot au un rol important în chimia medicamentului, întrucât aproximativ 75% dintre moleculele cu masă moleculară mică, aprobate de către FDA, conțin în structura lor unul sau mai mulți heterocicli cu azot.

Potențialul biologic ridicat al tiazolului este reflectat de numărul mare de molecule autorizate pentru uz clinic, care conțin acest heterociclu în structură, cu acțiuni farmacologice variate.

Progresele realizate în domeniul sintezei chimice a acestei entități structurale au condus la dezvoltarea a noi metode de sinteză, dar cea mai cunoscută și cea mai utilizată metodă de obținere a tiazolului rămâne sinteza Hantzsch. Numeroase protocoale de sinteză a compușilor bistiazolici de tipul tiazolil-linker-tiazoli au fost raportate în literatură, majoritatea având la bază reacția de condensare Hantzsch.

De asemenea, cercetările realizate în domeniul chimiei medicamentului au condus la obținerea a numeroși derivați tiazolici și bistiazolici de sinteză cu diferite activități biologice.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiul 1. Sinteza chimică și evaluarea activității anti-Candida *in silico* și *in vitro* a unor noi compuși 1,4-fenilen-bistiazolici

Având în vedere opțiunile limitate de tratament în infecțiile fungice invazive, respectiv necesitatea dezvoltării de noi compuși biologic activi în contextul creșterii incidenței infecțiilor cu tulpini fungice rezistente, și pornind de la potențialul biologic al derivaților tiazolici, evidențiat în cadrul studiilor publicate în literatura de specialitate, ne-am propus sinteza și caracterizarea unei serii de compuși 1,4-fenilen-bistiazolici divers substituiți (figura 1).

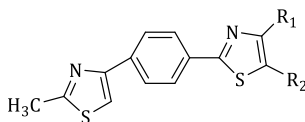


Fig.1. Structura generală a derivaților 1,4-fenilen-bistiazolici **A1-10**

Sinteza chimică a noilor derivați 1,4-fenilen-bistiazolici s-a realizat în trei etape, pornind de la tioacetamidă. Etapele principale au fost reprezentate de reacțiile de condensare Hantzsch, care au avut loc între componentele tioamidice și diferiți compuși alfa-halocarbonilici. Astfel, au fost obținuți cu randamente bune 10 compuși noi, divers substituiți fie cu resturi aromatice (fenil, naftil) sau cu resturi alifatic (acil, ester, clorometil).

Lanosterol 14 α -demetilaza (CYP51) este o țintă de acțiune validată, cercetarea în domeniul compușilor antifungici fiind orientată spre obținerea de potențiali inhibitori ai acesteia. Un studiu de andocare moleculară a fost realizat pentru a evalua modul de interacțiune între compușii sintetizați și enzima țintă. Compușii au prezentat o afinitate de legare bună față de ținta macromoleculară selectată. S-a observat prezența interacțiunilor hidrofobe cu aminoacizii care alcătuiesc buzunarul de acces către situsul activ al enzimei. Astfel, interacțiunile ligand-proteină prezente în cazul compușilor sintetizați sunt diferite de cele observate în cazul azolilor autorizați clinic, acest lucru fiind corelat cu un risc potențial scăzut de apariție a rezistenței fungice sau a toxicității *off-target*.

De asemenea, eficacitatea și siguranța unei substanțe sunt influențate de proprietățile farmacocinetice ale acesteia. Astfel, am realizat o predicție teoretică a proprietăților ADMET ale compușilor sintetizați. Rezultatele studiului ADMET *in silico* au indicat faptul că derivații obținuți prezintă proprietăți fizico-chimice și farmacocinetice favorabile, conform regulii lui Lipinski.

Potențialul antifungic a fost evaluat *in vitro* pe trei tulpini diferite de Candida: *C. albicans*, *C. parapsilosis* și *C. zeylanoides*, prin metoda microdiluțiilor. Derivații 1,4-

fenilen-bistiazolici au prezentat activitate antimicotică inferioară fluconazolului, utilizat ca antifungic de referință.

Rezultatele obținute în cadrul acestui studiu indică faptul că sunt necesare farmacomodulări chimice noi, aduse acestei serii de compuși, în vederea îmbunătățirii activității anti-*Candida in vitro*.

Studiul 2. Sinteza chimică și evaluarea activității anti-*Candida in silico* și *in vitro* a unor derivați eterici 1,4-fenilen-bistiazolici

Conform datelor din literatura de specialitate, azolii antifungici cu catenă laterală lungă prezintă o capacitate superioară de inhibiție a lanosterol 14 α -demetilazei fungice. Astfel, ne-am propus sinteza și caracterizarea unei noi serii de derivați 1,4-fenilen-bistiazolici cu potențial anti-*Candida*, prin modularea grupării OH fenolice și introducerea unor radicali alifatici sau aromatici suplimentari (figura 2).

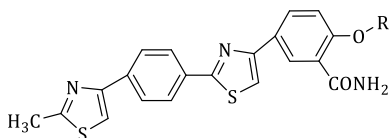


Fig. 2. Structura generală a derivaților eterici 1,4-fenilen-bistiazolici B1-10

Noii derivați eterici 1,4-fenilen-bistiazolici au fost obținuți cu randamente bune în urma alchilării intermediarului salicilamidic, utilizând diferiți derivați halogenați, în prezența carbonatului de potasiu. Caracterizarea fizico-chimică și analiza spectrală au confirmat identitatea și puritatea noilor compuși sintetizați.

A fost realizat un studiu de andocare moleculară cu scopul de a evalua interacțiunea dintre compușii noi sintetizați și enzima țintă, CYP51. S-a observat că derivații substituiți cu un fragment aromatic voluminos prezintă o afinitate de legare superioară față de ținta macromoleculară selectată, cu valori ale energiilor de legare mai mici. De asemenea, în cazul acestor compuși s-a observat prezența unor interacțiuni suplimentare cu enzima țintă.

Activitatea antifungică *in vitro* a fost evaluată utilizând metoda microdiluțiilor, pe trei tulpini diferite de *Candida*: *C. albicans*, *C. parapsilosis* și *C. zeylanoides*. Activitatea compușilor este inferioară fluconazolului, utilizat ca antifungic de referință.

De asemenea, a fost efectuat un studiu ADMET *in silico* pentru a evalua proprietățile *drug-like* ale noilor derivați 1,4-fenilen-bistiazolici sintetizați. Potențialul biologic redus al acestor compuși poate fi explicat pe baza proprietăților farmacocinetice aferente noilor molecule, estimate în cadrul studiului ADMET. Introducerea de noi fragmente voluminoase a condus la creșterea masei moleculare și a suprafeței polare, acest lucru fiind asociat cu o reducere a permeabilității prin membranele celulare.

Studiul 3. Sinteza chimică și evaluarea activității anti-Candida *in vitro* și *in silico* a unei noi serii de acilhidrazone 1,4-fenilen-bistiazolice

În primele etape ale dezvoltării de noi medicamente, se urmărește descoperirea de molecule mici farmacologic active, cu proprietăți farmacocinetice și toxicologice favorabile, astfel încât să devină posibili candidați pentru dezvoltarea preclinică și clinică. Activitatea biologică a unei molecule poate fi corelată cu lipofilia, proprietățile electronice și sterice imprimate de prezența grupărilor funcționale, cunoscute sub denumirea de farmacofori.

Pe baza unei ipoteze cu privire la structura farmacoforilor, publicată în literatura de specialitate, și pornind de la o serie de molecule cu activitate anti-Candida *in vitro* dovedită, am conceput un model structural nou, prin asocierea diferitelor elemente structurale, într-o singură entitate moleculară, cu scopul de a obține compuși noi cu proprietăți farmacologice superioare. Astfel, am sintetizat nouă acilhidrazone 1,4-fenilen-bistiazolice, prin transformarea intermediarului esteric, sub acțiunea hidratului de hidrazină, în hidrazida corespunzătoare, și condensarea ulterioară a acestuia cu diferite aldehide aromatice sau heteroaromatice (figura 3).

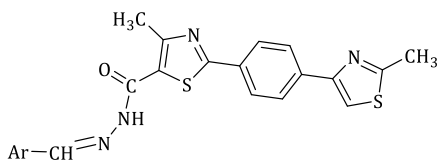


Fig. 3. Structura generală a acilhidrazonelor 1,4-fenilen-bistiazolice C1-9

Compușii sintetizați au fost caracterizați prin determinări fizico-chimice și spectrale, care au confirmat structura și puritatea moleculelor obținute. În urma evaluării activității anti-Candida *in vitro*, s-a observat că modulările structurale realizate în vederea obținerii acestor compuși au condus la creșterea activității biologice. Rezultatele au pus în evidență doi compuși ca fiind cei mai activi pe ambele tulpini de *Candida albicans*, respectiv un compus care a prezentat cea mai bună activitate pe tulpina de *Candida parapsilosis*. *Candida krusei* s-a dovedit a fi cea mai susceptibilă tulpină la acțiunea compușilor sintetizați, patru din cei nouă compuși prezentând o activitate egală cu cea a fluconazolului, utilizat ca antifungic de referință.

Studiul de andocare moleculară a investigat modul de interacțiune al compușilor sintetizați cu lanosterol 14 α -demetilaza fungică. Aceștia interacționează cu aminoacizii care formează canalul de acces către situsul activ al enzimei.

Rezultatele studiului ADMET *in silico* au indicat faptul că noii compuși prezintă proprietăți biofarmaceutice și farmacocinetice favorabile, conform regulii lui Lipinski, fiind potențiali candidați pentru dezvoltarea de molecule active pe cale orală. Compușii

nu par a traversa barierea hematoencefalică, și nu se leagă de CYP2D6 sau de glicoproteina P. Astfel, se poate presupune că riscurile de apariție a reacțiilor adverse la nivel central și a interacțiunilor de tip medicament-medicament sunt scăzute.

Studiul 4. Evaluarea lipofiliei derivaților 1,4-fenilen-bistiazolici prin metode teoretice și experimentale

Lipofilia influențează în mod direct farmacocinetica, farmacodinamia și toxicitatea unei substanțe medicamentoase. Astfel, investigarea lipofiliei unei molecule în fazele timpurii de dezvoltare este esențială. Obiectivul acestui studiu este reprezentat de determinarea lipofiliei derivaților 1,4-fenilen-bistiazolici sintetizați anterior, utilizând metode analitice, cum ar fi cromatografia pe strat subțire cu fază inversă (RP-TLC), cromatografia de lichide de înaltă performanță cu fază inversă (RP-HPLC) și metode computaționale.

Diferiți parametri de lipofilie au fost determinați pe baza factorului de retenție, R_f , obținut prin metoda RP-TLC și a timpului de retenție, t_R , obținut prin metoda RP-HPLC. Rezultatele experimentale au evidențiat faptul că natura și poziția grupelor funcționale influențează lipofilia moleculelor. În general, prezența atomilor de clor greșați pe nucleul benzenic conduce la o creștere a lipofiliei, iar prezența grupărilor hidroxil la o scădere a acesteia. Acest lucru poate fi explicat prin capacitatea compușilor substituiți cu grupări hidroxil de a forma legături de hidrogen cu moleculele de apă din componența fazei mobile, conducând la o scădere a lipofiliei.

Parametrii de lipofilie estimați pe baza determinărilor experimentale sunt în concordanță cu valorile $\log P$ teoretice, observându-se în general același profil în ceea ce privește cei mai lipofili, respectiv mai puțin lipofili derivați.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Cercetarea cuprinsă în această teză prezintă dezvoltarea chimică și farmacologică a unor noi serii de derivați 1,4-fenilen-bistiazolici divers substituiți în pozițiile 4 și 5. Au fost sintetizați 29 de compuși noi, grupați în 3 serii structurale, în funcție de modularile structurale realizate. Astfel, prima serie conține 10 compuși cu structura de bază 1,4-fenilen-bistiazolică, substituiți cu diferiți radicali alifatici sau aromatici. A doua serie conține 10 derivați eterici cu structura de bază 1,4-fenilen-bistiazolică, optimizarea structurală fiind realizată cu scopul de a obține compuși care prezintă afinitate superioară față de enzima țintă. A treia serie conține compuși cu structură hibridă, care s-au obținut pe baza unei ipoteze din literatura de specialitate cu privire la structura farmacoforilor responsabili de activitatea anti-Candida.

Determinarea activității anti-Candida *in vitro* a permis identificarea unor elemente structurale asociate cu o activitate inhibitorie bună pe anumite tulpini de

Candida. Astfel, am identificat unele molecule cu activitate similară cu cea a fluconazolului pe tulpinile de *Candida albicans*, *Candida krusei* și *Candida parapsilosis*.

Pentru toți compușii sintetizați s-au realizat studii de andocare moleculară și de evaluare a proprietăților ADMET *in silico*, aceste studii fiind foarte utile în domeniul dezvoltării de noi compuși bioactivi pentru a reduce rata de eșec a moleculelor în fazele ulterioare de dezvoltare. Studiul de andocare moleculară contribuie la înțelegerea modului în care compușii sintetizați interacționează cu lanosterol 14 α -demetilaza, respectiv a modului în care prezența anumitor substituenți influențează afinitatea ligandului față de ținta moleculară. Studiul de lipofilie realizat contribuie la o mai bună înțelegere a modului în care prezența anumitor substituenți influențează lipofilia moleculelor.

Astfel, cercetarea cuprinsă în această teză contribuie la lărgirea bibliotecilor de compuși, care pot fi optimizați prin farmacomodulări ulterioare în vederea identificării unei molecule *lead* cu activitate anti-Candida.

PhD THESIS SUMMARY

Contributions to the synthesis and biological activity evaluation of 1,4-phenylene- bisthiazole compounds

PhD student **Anca-Maria Borcea**

PhD supervisor **Prof. Dr. Ovidiu Oniga**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
ACTUAL STATE OF KNOWLEDGE	
1. General considerations on the synthesis and biological activity of thiazoles	19
1.1. Chemistry of thiazole	20
1.2. Synthesis of thiazole derivatives	21
1.2.1. Hantzsch synthesis	21
1.2.2. Gabriel synthesis	21
1.2.3. Cook-Heilbron synthesis	22
1.2.4. Reaction of active methylene isocyanides with methyl carbodithioates	22
1.2.5. Alkylation-cyclization reaction of substituted propargyl bromide with thioureas	23
1.2.6. Synthesis of thiazoles from oximes, anhydrides and potassium thiocyanate	24
1.2.7. Synthesis of thiazoles from amines, aldehydes and element sulphur	24
1.2.8. Synthesis of thiazoles from vinyl azides and potassium thiocyanate	25
1.3. Biological activity of thiazoles	26
1.3.1. Antimicrobial activity	26
1.3.2. Antiprotozoal activity	28
1.3.3. Antitumor activity	30
1.3.4. Other biological activities	32
2. General considerations on the synthesis and biological activity of bithiazoles	33
2.1. Synthesis of bithiazole compounds (thiazolyl-thiazoles and thiazolyl-linker-thiazoles)	33
2.1.1. Synthesis of thiazolyl-thiazole compounds	33
2.1.2. Synthesis of thiazolyl-linker-thiazole compounds	36
2.2. Biological activity of bithiazole derivatives	38

2.2.1. Antimicrobial activity	38
2.2.2. Antiprotozoal activity	40
2.2.3. Antitumor activity	41
2.2.4. Other biological activities	43

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Working hypothesis. Objectives	47
2. General methodology	51
3. Study 1 – Chemical synthesis, <i>in silico</i> and <i>in vitro</i> anti-Candida activity evaluation of new 1,4-phenylene-bisthiazole compounds	55
3.1. Introduction	55
3.2. Working hypothesis	57
3.3. Materials and methods	57
3.3.1. Chemical synthesis and structural analysis	57
3.3.2. Molecular docking study	59
3.3.3. <i>In silico</i> ADMET properties evaluation	59
3.3.4. <i>In vitro</i> anti-Candida activity evaluation	59
3.4. Results and discussions	60
3.4.1. Chemical synthesis and structural analysis	60
3.4.2. Molecular docking study	63
3.4.3. <i>In silico</i> ADMET properties evaluation	65
3.4.4. <i>In vitro</i> anti-Candida activity evaluation	68
3.5. Conclusions	69
4. Study 2 – Chemical synthesis, <i>in silico</i> and <i>in vitro</i> anti-Candida activity evaluation of 1,4-phenylene-bisthiazole ether derivatives	71
4.1. Introduction	71
4.2. Working hypothesis	72
4.3. Materials and methods	72
4.3.1. Chemical synthesis and structural analysis	72
4.3.2. Molecular docking study	73
4.3.3. <i>In silico</i> ADMET properties evaluation	74
4.3.4. <i>In vitro</i> anti-Candida activity evaluation	74
4.4. Results and discussions	74
4.4.1. Chemical synthesis and structural analysis	74
4.4.2. Molecular docking study	77
4.4.3. <i>In silico</i> ADMET properties evaluation	79
4.4.4. <i>In vitro</i> anti-Candida activity evaluation	81
4.5. Conclusions	82

5. Study 3 – Chemical synthesis, <i>in vitro</i> and <i>in silico</i> anti-Candida activity evaluation of a novel series of 1,4-phenylene-bisthiazole acylhydrazones	83
5.1. Introduction	83
5.2. Working hypothesis	84
5.3. Materials and methods	85
5.3.1. Chemical synthesis and structural analysis	85
5.3.2. <i>In vitro</i> anti-Candida activity evaluation	86
5.3.3. Molecular docking study	87
5.3.4. <i>In silico</i> ADMET properties evaluation	87
5.4. Results and discussions	87
5.4.1. Chemical synthesis and structural analysis	87
5.4.2. <i>In vitro</i> anti-Candida activity evaluation	92
5.4.3. Molecular docking study	94
5.4.4. <i>In silico</i> ADMET properties evaluation	96
5.5. Conclusions	98
6. Study 4 – Lipophilicity evaluation of 1,4-phenylene-bisthiazole derivatives by theoretical and experimental methods	99
6.1. Introduction	99
6.2. Working hypothesis	100
6.3. Materials and methods	101
6.4. Results and discussions	103
6.5. Conclusions	114
7. General conclusions	115
8. Originality and innovative contributions of the thesis	119
REFERENCES	121

Keywords: 1,4-phenylene-bisthiazoles, chemical synthesis, anti-Candida, molecular docking, ADMET, lipophilicity

INTRODUCTION

Fungal infections have become one of the leading causes of mortality and morbidity in immunocompromised patients. The increased number of invasive fungal infections is associated with an increased number of people with certain medical conditions or associated risk factors, including HIV infection, primary immunodeficiency, hematopoietic stem cells and solid organ transplantation, prematurity, treatment with chemotherapy and immunomodulatory agents.

Current therapeutic options are limited to a few drug classes that are frequently associated with intrinsic or acquired resistance, possess a relatively high toxicity and are expensive.

In this context, the development of new compounds with antifungal activity, that are characterized by a high selectivity of the fungal cell, by the absence of *off-target* toxicity, that act through a new mechanism of action or bind to a different site on a validated target, represents a research priority in the field of medicinal chemistry.

ACTUAL STATE OF KNOWLEDGE

Nitrogen-containing heterocyclic compounds play an important role in the drug discovery process, as approximately 75% of FDA-approved small-molecule drugs contain one or more nitrogen-based heterocycles.

The high medicinal significance of thiazole is reflected in a large number of clinically approved thiazole-containing molecules, with an extensive range of pharmacological activities.

Recent advances regarding the chemical synthesis of this structural entity have led to the development of new synthesis methods, but the most widely known and commonly used method of obtaining the thiazole ring remains Hantzsch synthesis. Numerous protocols for the synthesis of thiazolyl-linker-thiazole compounds have been reported in the literature, most of them being based on the Hantzsch condensation reaction.

Also, research in the field of medicinal chemistry has led to numerous synthetic thiazole and bistiazole derivatives with diverse biological activities.

PERSONAL CONTRIBUTION

Study 1 - Chemical synthesis, *in silico* and *in vitro* anti-Candida activity evaluation of new 1,4-phenylene-bisthiazole compounds

Considering the limited treatment options for invasive fungal infections, the need for new biologically active compounds in the context of an increased prevalence of antifungal resistance and the biological potential of thiazole derivatives, highlighted in recently published studies, we focused on the synthesis and characterization of a series of various substituted 1,4-phenylene-bisthiazole compounds (figure 1).

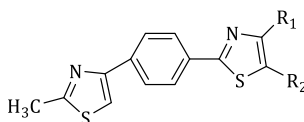


Fig.1. General structure of 1,4-phenylene-bisthiazole derivatives **A1-10**

The chemical synthesis of the new 1,4-phenylene-bisthiazole derivatives was performed in three steps, starting from thioacetamide. The main steps were represented by the Hantzsch condensation reactions, which took place between the thioamide components and various alpha-halocarbonyl compounds. Thus, 10 new compounds, various substituted with either aromatic (phenyl, naphthyl) or aliphatic (acyl, ester, chloromethyl) residues, were obtained in good yields.

Lanosterol 14 α -demethylase (CYP51) is a validated target, research in the field of antifungal drug discovery being focused on obtaining potential CYP51 inhibitors. A molecular docking study was performed in order to evaluate the interaction between the synthesized compounds and the target enzyme. The molecular docking results showed good binding affinity of the compounds towards the selected macromolecular target. The presence of hydrophobic interactions involving the amino acids from the access channel to the active site of the enzyme was noticed. Thus, the ligand-protein interactions observed in the case of the synthesized compounds, are different from those seen in the case of clinically approved azoles, this being correlated with a potentially low risk for developing antifungal resistance or off-target toxicity.

Moreover, the efficacy and safety of a new drug are influenced by its pharmacokinetic properties. Thus, a theoretical prediction of ADMET properties of the synthesized compounds was performed. The *in silico* ADMET study revealed that the synthesized derivatives possess favourable physicochemical and pharmacokinetic properties, according to Lipinski's Rule of Five.

The *in vitro* anti-Candida activity was evaluated against three different Candida strains: *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. zeylanoides*, using the broth microdilution

method. The synthesized 1,4-phenylene-bisthiazole derivatives showed inferior antifungal activity, compared with fluconazole, used as a reference substance.

Hence, the results obtained in this study indicated that new chemical pharmacomodulations of the compounds are required in order to improve the *in vitro* anti-Candida activity.

Study 2 – Chemical synthesis, *in silico* and *in vitro* anti-Candida activity evaluation of 1,4-phenylene-bisthiazole ether derivatives

According to literature, long-tailed azole antifungals possess a superior capacity to inhibit fungal lanosterol 14 α -demethylase. Thus, we aimed to synthesized and characterize a new series of 1,4-phenylene-bisthiazole derivatives, through the chemical modulation of the phenolic hydroxyl group and the addition of various aliphatic or aromatic radicals (figure 2).

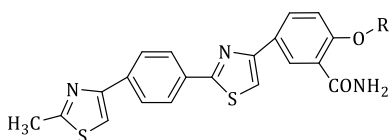


Fig. 2. General structure of 1,4-phenylene-bisthiazole ether derivatives **B1-10**

The new 1,4-phenylene-bisthiazole ether derivatives were obtained in good yields, following the alkylation of the salicylamide intermediate with different halogen derivatives, in the presence of potassium carbonate. Physicochemical characterization and spectral analysis confirmed the identity and purity of the new synthesized compounds.

A molecular docking study was performed in order to evaluate the interaction between the newly synthesized compounds and the target enzyme, CYP51. It was observed that compounds substituted with a voluminous aromatic fragment had a higher binding affinity towards the selected macromolecular target, showing lower binding free energy values. Also, in the case of these compounds, additional interactions with the target enzyme were present.

In vitro antifungal activity was assessed using the broth microdilution method on three different Candida strains: *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. zeylanoides*. The *in vitro* anti-Candida activity of the synthesized compounds was inferior to the one of fluconazole, used as a reference antifungal. An *in silico* ADMET study was also performed in order to evaluate the drug-like properties of the newly synthesized derivatives. The inferior biological activity of these compounds can be explained based on their pharmacokinetic properties estimated in the ADMET study. The introduction of voluminous fragments has led to an increase in the molecular weight and polar surface area, this being associated with reduced cell-membrane permeability.

Study 3 – Chemical synthesis, *in vitro* and *in silico* anti-Candida activity evaluation of a novel series of 1,4-phenylene-bisthiazole acylhydrazones

The main objective of the early stages of drug development is to discover pharmacologically active small molecules with favourable pharmacokinetic and toxicological profiles so as to become possible candidates for preclinical and clinical development. The biological activity of a molecule can be correlated with lipophilicity and the electronic and steric properties imprinted by the presence of functional groups, known as pharmacophores.

Based on a published hypothesis regarding the structure of pharmacophores and on several molecules with *in vitro* anti-Candida activity, we focused on designing a new scaffold, by associating various structural moieties on the same chemical structure, in order to obtain new compounds with improved pharmacological properties. Thus, we synthesized nine 1,4-phenylene-bisthiazole acylhydrazones by the reaction of the ester intermediate with hydrazine hydrate, giving the corresponding carbohydrazide, followed by its subsequent condensation with various aromatic or heteroaromatic aldehydes (figure 3).

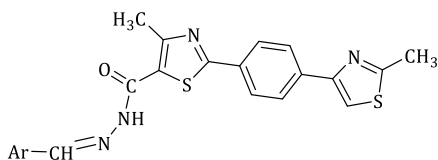


Fig. 3. General structure of 1,4-phenylene-bisthiazole acylhydrazones C1-9

The synthesized compounds were characterized by physicochemical and spectral determinations, which confirmed their structures and purity. The evaluation of the *in vitro* anti-Candida activity showed that the structural modulations performed led to an increased biological activity. The results highlighted two compounds as the most active on both strains of *Candida albicans*, respectively one compound that showed the highest activity against *Candida parapsilosis*. *Candida krusei* seemed to be the most susceptible among the tested strains, four of the nine compounds displaying activity equal to fluconazole, used as a reference antifungal.

The molecular docking study was focused on analyzing the binding mode of the synthesized compounds towards lanosterol 14 α -demethylase. All interactions which took place between the tested compounds and the target enzyme involve amino acids residues from the access channel to the catalytic site of the enzyme.

The results of the *in silico* ADMET screening revealed that the new compounds possess favourable biopharmaceutical and pharmacokinetic properties, according to Lipinski's Rule of Five, making them suitable for further development as oral drug

candidates. Moreover, the compounds are not predicted to pass the blood-brain barrier or to inhibit CYP2D6 and P-glycoprotein, so the risks for central nervous system side effects and drug-drug interactions are assumed to be low.

Study 4 – Lipophilicity evaluation of 1,4-phenylene-bisthiazole derivatives by theoretical and experimental methods

Lipophilicity directly influences the pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicity of a drug substance. Thus, the evaluation of lipophilicity of a molecule in earlier stages of development is essential. The aim of this study was to determine the lipophilicity of previously synthesized 1,4-phenylene-bisthiazole derivatives using analytical methods, such as reversed-phase thin layer chromatography (RP-TLC), reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and computational methods.

Various lipophilicity parameters were determined based on the retention factor, R_f , obtained by the RP-TLC method and the retention time, t_R , obtained by the RP-HPLC method. The obtained results showed that the lipophilicity of the molecules is influenced by the type and position of functional groups. In general, the presence of chlorine atoms on the benzene ring led to an increase in lipophilicity, while the presence of hydroxyl groups led to a decrease in lipophilicity. This can be explained by the ability of hydroxyl-substituted compounds to form hydrogen bonds with water molecules from the mobile phase, leading to a reduction in lipophilicity.

The experimentally determined lipophilicity parameters are in accordance with the theoretical log P values, the same profile being observed regarding the most lipophilic and the least lipophilic derivatives.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

The research included in this thesis presents the chemical and pharmacological development of some novel series of 1,4-phenylene-bisthiazole derivatives various substituted at positions 4 and 5. Twenty-nine newly synthesized compounds were grouped in three structural series, depending on the structural modulations realized. Thus, the first series contains 10 compounds bearing 1,4-phenylene-bisthiazole scaffold, substituted with various aliphatic or aromatic radicals. The second series contains 10 1,4-phenylene-bisthiazole ether derivatives, the structural optimization being performed in order to obtain compounds with higher affinity for the target enzyme. The third series contains hybrid molecules, designed based on a published hypothesis regarding the structure of pharmacophores responsible for anti-Candida activity.

The *in vitro* anti-Candida activity evaluation allowed the identification of some structural elements associated with the presence of a good inhibitory activity against

certain *Candida* strains. Thus, we identified some molecules with an inhibitory activity similar to fluconazole on *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida parapsilosis* strains.

Molecular docking simulations and *in silico* ADMET studies were performed for all synthesized compounds, these studies being very useful in the field of medicinal chemistry in order to reduce the failure rate of molecules in later stages of development. The molecular docking study contributes to the understanding of how the synthesized compounds interact with lanosterol 14 α -demethylase and how the presence of certain substituents influences the binding affinity of the ligand towards the molecular target. Lipophilicity evaluation led to a better understanding of how the presence of certain substituents influences the lipophilicity of the molecules.

Thus, the present research contributes to the enlargement of the libraries of compounds, that can be optimized by subsequent pharmacomodulations in order to identify a lead molecule with anti-*Candida* activity.