

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL FARMACIE

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. LIMBAN CARMEN

Student-doctorand:

GURGU HOREA

2019

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL FARMACIE

*Sinteza unor noi amide ale acizilor 2-(4-R-fenoximetil)benzoici cu
potențială acțiune farmacologică*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. LIMBAN CARMEN

Student-doctorand:

GURGU HOREA

2019

Motto

“The most fruitful basis for the discovery of a new drug is to start with an old drug.”

Sir James Whyte Black,

laureat al premiului Nobel pentru Fiziologie sau Medicină

Cuprins

| | |
|--|----|
| Abrevieri și simboluri | 6 |
| Mulțumiri | 8 |
| Introducere | 10 |
| I. Stadiul cunoașterii | |
| Capitolul 1. Tendințe și principii în descoperirea și dezvoltarea de medicamente | 12 |
| Capitolul 2. Benzamide cu potențial terapeutic | 17 |
| 2.1. Generalități | 17 |
| 2.2. Benzamide cu acțiune antimicrobiană | 18 |
| 2.3. Benzamide cu acțiune analgezică | 30 |
| 2.4. Benzamide cu acțiune antitumorală | 34 |
| 2.5. Benzamide cu alte acțiuni farmacologice | 39 |
| Capitolul 3. Carbamotioil-benzamide cu potențial terapeutic | 43 |
| 3.1. Generalități | 43 |
| 3.2. Carbamotioil-benzamide cu acțiune antimicrobiană | 44 |
| 3.3. Carbamotioil-benzamide cu acțiune antivirală | 51 |
| 3.4. Carbamotioil-benzamide cu acțiune analgezică | 54 |
| 3.5. Carbamotioil-benzamide cu acțiune antitumorală | 57 |
| Capitolul 4. Metode <i>in silico</i> aplicate în descoperirea și dezvoltarea de medicamente | 61 |
| II. Contribuții personale | |
| Capitolul 5. Ipoteza de lucru și obiectivele generale | 66 |
| Capitolul 6. Sinteza și caracterizarea unor noi amide ale acizilor 2-(4-R-fenoximetil) benzoici | 68 |
| 6.1. Introducere | 68 |
| 6.2. Rezultate și discuții | 70 |
| 6.3. Materiale și metode | 78 |
| 6.3.1. Obținerea acidului 2-(4-R-fenoximetil)benzoic | 79 |
| 6.3.2. Obținerea clorurilor acizilor 2-(4-R-fenoximetil)benzoici | 80 |
| 6.3.3. Obținerea N-(2-dimetilaminoetil)-3-R ₁ -anilinelor | 80 |
| 6.3.4. Obținerea clorhidraților N-[2-(dimetilamino)etil]-N-3-R ₁ -fenil-2-(4-R-fenoximetil)benzamidelor | 81 |

| | |
|---|-----|
| 6.3.5. Obținerea clorhidraților N-[2-di-R ₂ -amino)etil]-2-(4-R-fenoximetil)benzamidelor | 83 |
| 6.3.6. Obținerea N-(1-adamantilcarbamoil)-2-((4-R-fenoxi)metil)benzamidelor | 85 |
| 6.3.7. Obținerea acizilor 2-(3-(2-((4-R-fenoxi)metil)benzoil)tioureido)benzoici | 87 |
| 6.3.8. Obținerea N-((2-(di-R ₂ -amino)etil)carbamoil)-2-((4-R-fenoxi)metil)benzamidelor | 88 |
| 6.3.9. Obținerea ((2-((4-etilfenoxi)metil)benzoil)carbamoil)glicinei și a ((2-((4-R-fenoxi)metil)benzoil)carbamoil)alaninelor | 89 |
| 6.4. Concluzii | 91 |
| Capitolul 7. Dovedirea structurii chimice și a purității compușilor sintetizați | 92 |
| 7.1. Spectrometria în infraroșu | 92 |
| 7.1.1. Introducere | 92 |
| 7.1.2. Materiale și metode | 92 |
| 7.1.3. Rezultate și discuții | 93 |
| 7.2. Spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară | 93 |
| 7.2.1. Introducere | 93 |
| 7.2.2. Materiale și metode | 94 |
| 7.3. Spectrometria de masă de înaltă rezoluție | 94 |
| 7.3.1. Introducere | 94 |
| 7.3.2. Materiale și metode | 95 |
| 7.3.3. Rezultate și discuții | 96 |
| 7.4. Analiza elementală | 98 |
| 7.5. Date experimentale | 98 |
| 7.6. Concluzii | 116 |
| Capitolul 8. Determinarea activității antimicrobiene a noilor compuși | 117 |
| 8.1. Introducere | 117 |
| 8.2. Materiale și metode | 118 |
| 8.2.1. <i>Screening</i> -ul calitativ al activității antimicrobiene prin metoda difuzimetrică | 120 |
| 8.2.2. Determinarea cantitativă a concentrației minime inhibitorii prin metoda microdiluțiilor | 120 |
| 8.2.3. Evaluarea activității anti-biofilm prin determinarea CMEB | 121 |

| | |
|---|-----|
| 8.3. Rezultate și discuții | 122 |
| 8.3.1. <i>Screening</i> -ul calitativ prin metoda difuzimetrică | 122 |
| 8.3.2. Determinarea cantitativă a concentrației minime inhibitorii Protocol A | 129 |
| 8.3.3. Determinarea cantitativă a concentrației minime inhibitorii Protocol B | 134 |
| 8.3.4. Evaluarea activității anti-biofilm prin determinarea CMEB | 137 |
| 8.4. Concluzii | 140 |
| Capitolul 9. Determinarea citotoxicității <i>in vitro</i> | 142 |
| 9.1. Introducere | 142 |
| 9.2. Materiale și metode | 142 |
| 9.3. Rezultate și discuții | 143 |
| 9.4. Concluzii | 148 |
| Capitolul 10. Cercetări farmacologice asupra noilor amide ale acizilor 2-(4-R-fenoxi-metil) benzoici | 149 |
| 10.1. Introducere | 149 |
| 10.2. Materiale și metode | 150 |
| 10.2.1. Animale | 150 |
| 10.2.2. Substanțe utilizate | 151 |
| 10.2.3. Determinarea toxicității acute prin metoda <i>up-and-down</i> | 151 |
| 10.2.4. Metode pentru evaluarea sensibilității dureroase | 151 |
| 10.2.4.1. Metoda plăcii fierbinți (<i>hot plate</i>) | 151 |
| 10.2.4.2. Metoda stimulului chimic (testul contorsionării) | 152 |
| 10.2.5. Protocol experimental | 153 |
| 10.2.5.1. Determinarea toxicității acute | 153 |
| 10.2.5.2. Determinarea acțiunii analgezice | 153 |
| 10.3. Rezultate | 153 |
| 10.3.1. Rezultatele privind determinarea toxicității acute după administrare orală | 153 |
| 10.3.2. Rezultatele experimentale privind pragul perceperii sensibilității dureroase determinat prin testul Hot plate | 155 |
| 10.3.3. Rezultatele experimentale privind pragul perceperii sensibilității dureroase determinat prin testul stimulului chimic | 162 |
| 10.4. Discuții | 165 |
| 10.5. Concluzii | 166 |

| | |
|--|-----|
| Capitolul 11. Studii de docking molecular | 168 |
| 11.1. Introducere | 168 |
| 11.2. Materiale și metode | 170 |
| 11.3. Rezultate și discuții | 170 |
| 11.4. Concluzii | 177 |
| Capitolul 12. Determinarea profilului ADMET prin metode <i>in silico</i> | 178 |
| 12.1. Introducere | 178 |
| 12.2. Materiale și metode | 179 |
| 12.3. Rezultate și discuții | 180 |
| 12.3.1. Determinarea caracterului <i>drug-like</i> | 180 |
| 12.3.2. Determinarea profilului ADMET | 183 |
| 12.3.2.1. Determinarea profilului farmacocinetic | 185 |
| 12.3.2.2. Determinarea profilului farmacotoxicologic | 188 |
| 12.4. Concluzii | 192 |
| Capitolul 13. Concluzii generale | 194 |
| Capitolul 14. Elemente de originalitate și perspective de cercetare | 197 |
| Bibliografie | 199 |
| Lista cu lucrările științifice publicate și participări la proiecte | 216 |
| Anexe | 218 |

Mulțumiri

Realizarea acestei teze de doctorat nu ar fi fost posibilă fără sprijinul, îndrumarea, profesionalismul și răbdarea doamnei **Prof. Dr. Carmen Limban**, care mi-a oferit oportunitatea de a lucra în domeniul Chimiei Farmaceutice. Doresc pe această cale să-i aduc cele mai sincere sentimente de mulțumire și recunoștință.

Le mulțumesc colegilor din cadrul disciplinei de Chimie Farmaceutică, **Conf. Dr. Diana Nuță, Prof. Dr. Camelia Stecoza, Prof. Dr. Mihai Nițulescu, Conf. Dr. Carmellina Bădiceanu, Prof. Dr. Alexandru Missir, Prof. Dr. Laurențiu Morușciag și Prof. Dr. Ileana Chiriță** pentru sfaturile acordate în realizarea studiilor de cercetare.

Doresc să-i mulțumesc domnului **Dr. Miron T. Căproiu** de la Centrul de Chimie Organică al Academiei Române "C.D. Nenițescu", București pentru profesionalismul și tot sprijinul acordat în realizarea analizelor spectrale.

Sincere mulțumiri doamnei **Prof. Dr. Simona Negreș**, doamnei **Conf. Dr. Cristina Zbârcea**, domnului **Asist. Univ. Dragoș Mihai** și domnului **Prof. Dr. Cornel Chiriță** de la disciplina de Farmacologie și Farmacie clinică pentru sfaturile și sprijinul în efectuarea experimentelor farmacologice și de docking molecular.

Doresc să aduc deosebite mulțumiri doamnei **Prof. Dr. Carmen M. Chifiriuc** de la Departamentul de Microbiologie, Facultatea de Biologie, Universitatea București, pentru determinarea activității antimicrobiene.

Îi mulțumesc doamnei **Dr. Coralia Bleotu** de la Institutul de Virusologie "Prof. Șt. Nicolau", București pentru determinarea citotoxicității.

Doresc să-i mulțumesc domnului **Conf. Dr. Flavian S. Rădulescu** de la disciplina de Industria Medicamentului și Biotehnologiei Farmaceutice pentru îndrumarea acordată în realizarea studiilor de ADMET.

Îi mulțumesc domnului **Prof. Dr. Roderich Süßmuth** de la Institut für Organische Chemie, Technische Universität Berlin pentru posibilitatea de a lucra în grupul dânsului de cercetare, realizarea spectrelor de HRMS și determinarea activității antimicrobiene.

Doresc să le mulțumesc **părinților și fratelui** meu pentru sprijinul moral acordat pe tot parcursul tezei.

Prietenilor mei **Răzvan C**, **Sebastian M** și **Mihai B** le mulțumesc pentru nenumăratele conversații și susținerea necondiționată.

Nu în ultimul rând, aș vrea să-i mulțumesc soției mele **Mădălina**, care a fost alături de mine la fiecare pas și cu care am trăit toate emoțiile tezei. Ajutorul tău este neprețuit.

Introducere

În ultimii 150 de ani speranța de viață în țările civilizate aproape s-a dublat. Acest fapt se datorează în mare măsură dezvoltării industriei farmaceutice, un prim punct de inflexiune fiind descoperirea vaccinurilor și a antibioticelor [1]. Conform Drugbank, numărul total de medicamente aprobate se ridică la 3732, dintre care 2538 au moleculă mică [2]. Deși medicamentele biologice au luat un avânt considerabil în ultimii ani, medicamentele cu moleculă mică prezintă o serie de avantaje: masă moleculară <700 Da, structură chimică bine definită, stabilitate fizico-chimică bună, cale de administrare non-invazivă (orală), permeabilitate mare prin membrane biologice, cost de producție scăzut [3].

În această lucrare am urmărit îmbinarea diverselor motive structurale (acid 2-fenoximetilbenzoic cu benzamide, carbamotioil benzamide, adamantan, amine aromatice și alifatică, aminoacizi) pentru a obține compuși biologic activi.

Pentru compușii sintetizați am urmărit investigarea următoarelor acțiuni biologice:

- acțiunea antimicrobiană, deoarece în această clasă terapeutică este o mare nevoie de a descoperi noi molecule [4], iar benzamidele s-au dovedit a fi o clasă promițătoare pentru această acțiune [5];
- acțiunea analgezică, datorită prezenței motivului structural acid 2-fenoximetilbenzoic, care a dovedit acțiune analgezică prin blocarea receptorilor nociceptinei [6].

Lucrarea de față este structurată în două părți: stadiul cunoașterii și contribuții personale.

În capitolele dedicate stadiului cunoașterii am prezentat tendințele și principiile actuale în cercetarea de noi medicamente, o imagine generală a claselor de benzamide și carbamotioil-benzamide cu diverse acțiuni terapeutice și o descriere a metodelor *in silico* aplicate în cercetarea farmaceutică.

În partea de contribuții personale, am urmărit realizarea unui proiect complex privind sinteza, testarea biologică și studiile *in silico* ale unor noi compuși necitați în literatura de specialitate:

- sinteza și caracterizarea unor noi amide ale acizilor 2-(4-R-fenoximetil)benzoici (Fig. 1.);

➤ evaluarea acțiunii biologice prin determinarea:

- acțiunii antimicrobiene;
- citotoxicității *in vitro*;
- toxicității acute;
- acțiunii analgezice *in vivo*;

➤ studii *in silico*:

- studii de docking molecular;
- determinarea profilului ADMET.

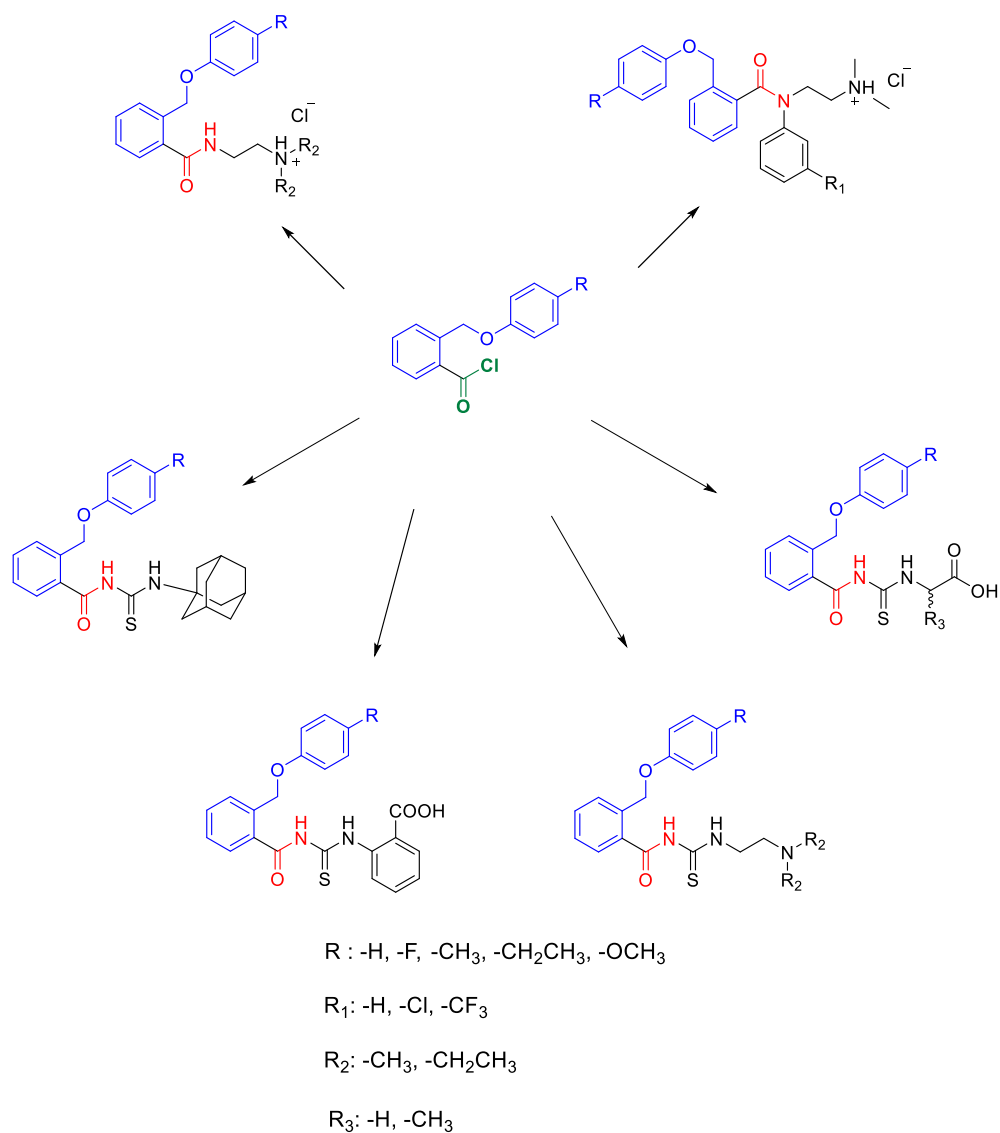


Fig. 1. Compușii obținuți, folosind ca intermediari de bază clorurile acizilor 2-(4-R-fenoximetil)benzoici

I. Stadiul cunoașterii

Capitolul 1. Tendințe și principii în descoperirea și dezvoltarea de medicamente

Descoperirea și dezvoltarea de medicamente este un proces laborios și complex care se întinde pe o perioadă îndelungată de timp (aproximativ 12 ani) și implică costuri și resurse considerabile (aproximativ 1 miliard de dolari) (Fig. 1.1.). Fazele dezvoltării unui medicament implică patru etape principale. În prima etapă, cea de descoperire se identifică ținta terapeutică. Genomica și proteomica au realizat progrese considerabile în ultimii ani, numărul total de posibile ținte terapeutice fiind estimat la peste 3000 [7]. După realizarea metodologiilor necesare de testare se obțin librării de compuși pentru a identifica compuși *hit* și apoi *lead*. În a 2-a etapă de cercetare compușii *lead* sunt optimizați pentru a le îmbunătăți profilul ADMET. Astfel, în studii clinice ajung doar un număr mic de candidați, dintre care eventual unul va reuși să ajungă în faza de aprobare de către autoritățile responsabile [8].

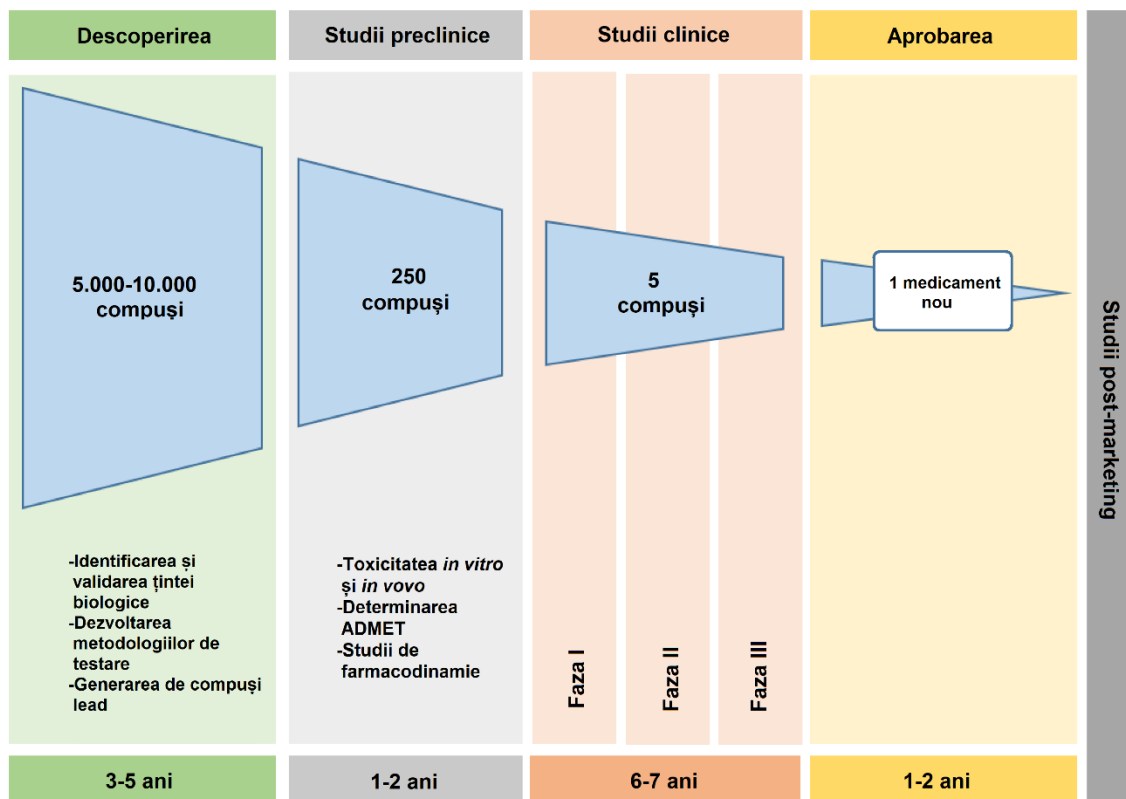


Fig. 1.1. Etapele descoperirii și dezvoltării unui medicament [8]

Capitolul 2. Benzamide cu potențial terapeutic

Grupa amidică este una dintre cele mai răspândite grupe funcționale, fiind prezentă atât în natură, în cadrul peptidelor și a proteinelor, dar și în numeroase medicamente și compuși de sinteză cu potențial farmacologic. O analiză profundă a bazelor de date care cuprind compuși biologic activi, a relevat faptul că grupa amidică este prezentă în peste 25% dintre medicamentele cunoscute [9]. Acest lucru nu este neapărat surprinzător, având în vedere faptul că amidele sunt neutre, stabile și au posibilitatea de a forma legături de hidrogen cu proteinele (enzime, receptori) [10].

Benzamidele sunt amidele acizilor benzoici (benzencarboxilici), în care grupa amidică este legată direct de un nucleu aromatic. Datorită varietății structurale mari, benzamidele se regăsesc în numeroase clase farmacologice, cu reprezentanți care se folosesc curent în terapie. Amintim următoarele clase de benzamide: antipsihotice (tiaprid, sulpirid, amisulpirid) [11], antidepresive (moclobemid) [12], antiaritmice (procainamidă, encainidă, flecainidă) [13], antihipertensive (labetalol, xipamid) [14], gastroprokinetice și antiemetice (metoclopramid, cisaprid) [15], antiastmatice (pranlukast, zafirlukast) [16], antineoplazice (procarbazină, imatinib) [17], antimicotice (buclosamid) [18], antiparazitare (niclosamid, oxiclozanid, closantel) [19].

Un interes deosebit pentru cercetările prezentate în lucrarea de față, îl prezintă benzamidele cu proprietăți antimicrobiene. Deși momentan niciun compus nu a fost introdus în terapie pentru această acțiune, există numeroși candidați cu potențial foarte bun pentru combaterea unor germeni precum *Staphylococcus aureus* [20], *Clostridium difficile* [21], *Mycobacterium tuberculosis* [22].

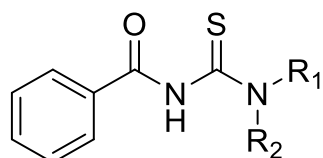
În cadrul benzamidelor cu acțiune analgezică sau antineoplazică sunt reprezentanți care au fost deja introduși în terapie sau care au fost aprobați pentru studii clinice [23,24].

Capitolul 3. Carbamotioil-benzamide cu potențial terapeutic

Carbamotioil-benzamidele sunt o clasă de compuși cu structură privilegiată (Fig. 3.1.), care le conferă un spectru larg de proprietăți farmacologice. Compușii din această clasă au dovedit acțiuni biologice precum: antimicrobiană [25], antifungică [26], antiparazitară [27], amoebicidă [28], antitumorală [29], antivirală [30], antioxidantă [31], analgezică [32], antiinflamatoare [33]. Aceștia posedă și acțiuni biologice utile în agricultură: insecticidă [34], ierbicidă [35], pesticidă [36] și fungicidă [37].

Datorită structurii versatile, carbamotioil-benzamidele și-au găsit locul și în aplicații precum: chemosenzori [38], organocatalizatori [39], materiale adsorbante [40], surfactanți [41].

Totodată, această clasă de compuși este o resursă importantă pentru cercetători, deoarece oferă acces către noi căi de sinteză prin formarea de complecși cu ionii metalici [42] sau prin reacțiile de ciclizare [43].



R₁, R₂ : alchil, aril, aralchil, heterocicil, (ne)substituiti

Fig. 3.1. Formula generală a carbamotioil-benzamidelor

II. Contribuții personale

Capitolul 5. Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Descoperirea și dezvoltarea de noi entități moleculare cu acțiune terapeutică a cunoscut un avânt extraordinar în ultimele decenii. La nivelul anului 2019 numărul total de medicamente aprobate se ridică la 3732, dintre care 2538 au moleculă mică, conform Drugbank [2]. Medicamentele cu structură benzamidică ocupă un loc important, cuprinzând reprezentanți ai unor clase terapeutice semnificative precum: antipsihotice (tiaprid, sulpirid, amisulpirid) [11], antidepresive (moclobemid) [12], antiaritmice (procainamidă, encainidă, flecainidă) [13], antihipertensive (labetalol, xipamid) [14], gastroprokinetice și antiemetice (metoclopramid, cisaprid) [15], antiastmatice (pranlukast, zafirlukast) [16], antineoplazice (procarbazină, imatinib) [17], antimicotice (buclosamid) [18], antiparazitare (niclosamid, oxiclozanid, closantel) [19].

Amidele acizilor 2-(4-R-fenoximetil)benzoici sunt o clasă de compuși cu potențială acțiune farmacologică. Deoarece, în timp, numeroase microorganisme au devenit rezistente la antibioticele clasice, tratamentul în cazul anumitor infecții este foarte dificil. De aceea este necesară explorarea și dezvoltarea unor noi clase terapeutice pentru combaterea bolilor infecțioase [44].

Pe baza cercetărilor anterioare, derivații acizilor 2-(4-R-fenoximetil)benzoici sintetizați de colectivul disciplinei de Chimie Farmaceutică au dovedit acțiune antimicrobiană bună pe diverse tulpini de patogeni precum: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* [45].

Datorită similarității structurale cu antagoniști ai receptorilor nociceptinei, noile benzamide au un potențial bun pentru acțiune analgezică [6].

Astfel, plecând de la aceste ipoteze, ne propunem să aprofundăm explorarea acestei clase de compuși prin sinteza de noi reprezentanți și testarea acțiunii acestora.

Obiectivele generale propuse pentru realizarea tezei au fost:

1. sinteza și purificarea unor noi amide ale acizilor 2-(4-R-fenoximetil)benzoici;
2. confirmarea structurii acestora;
3. determinarea acțiunii antimicrobiene;
4. determinarea citotoxicității *in vitro*;
5. testări farmacologice:

- a) studii de toxicitate acută;
 - b) evaluarea acțiunii analgezice:
 - i. metoda plăcii fierbinți (*hot plate*);
 - ii. metoda stimulului chimic (testul contorsionării);
6. studii *in silico*:
- a) studii de docking molecular;
 - b) determinarea profilului ADMET.

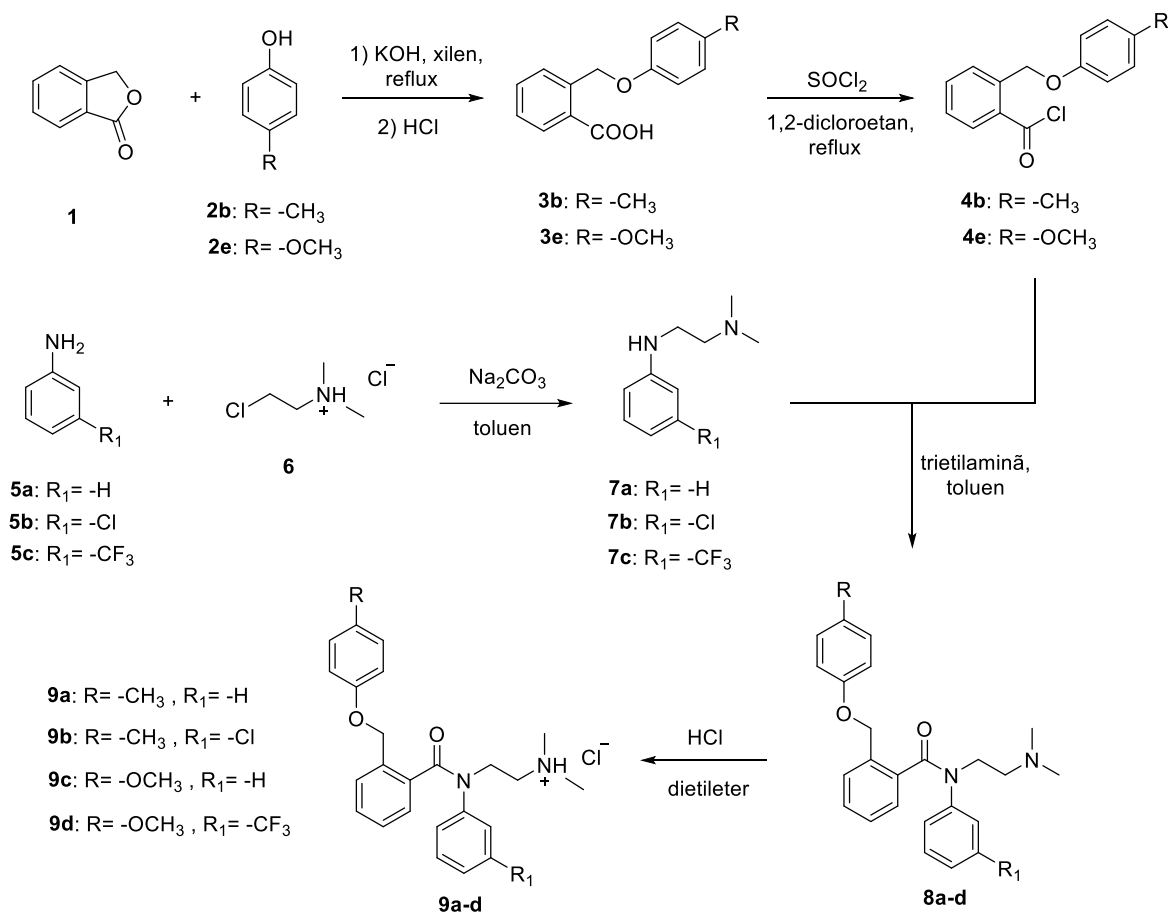
Capitolul 6. Sinteza și caracterizarea unor noi amide ale acizilor 2-(4-R-fenoxi-metil)benzoici

Grupa amidică este una dintre cele mai răspândite grupe din structura medicamentelor, iar reacțiile de obținere a amidelor sunt unele dintre cele mai studiate și frecvent utilizate reacții. Într-un studiu analitic al metodelor de sinteză în chimia farmaceutică, s-a observat că la nivelul anului 2014 reacția de obținere a amidelor a fost menționată în aproximativ 50% dintre toate manuscrisele analizate [46].

Astfel, în această lucrare, sinteza noilor amide ale acizilor 2-(4-R-fenoxi-metil)benzoici a decurs în mai multe etape, folosind ca intermediari cheie clorurile acizilor 2-(4-R-fenoxi-metil)benzoici.

Pentru obținerea clorhidraților N-[2-(dimetilamino)etil]-N-3-R₁-fenil-2-(4-R-fenoximetil)benzamidelor (**9a-d**) am urmat o sinteză eficientă în 5 etape, descrisă în Schema 6.5. [47]:

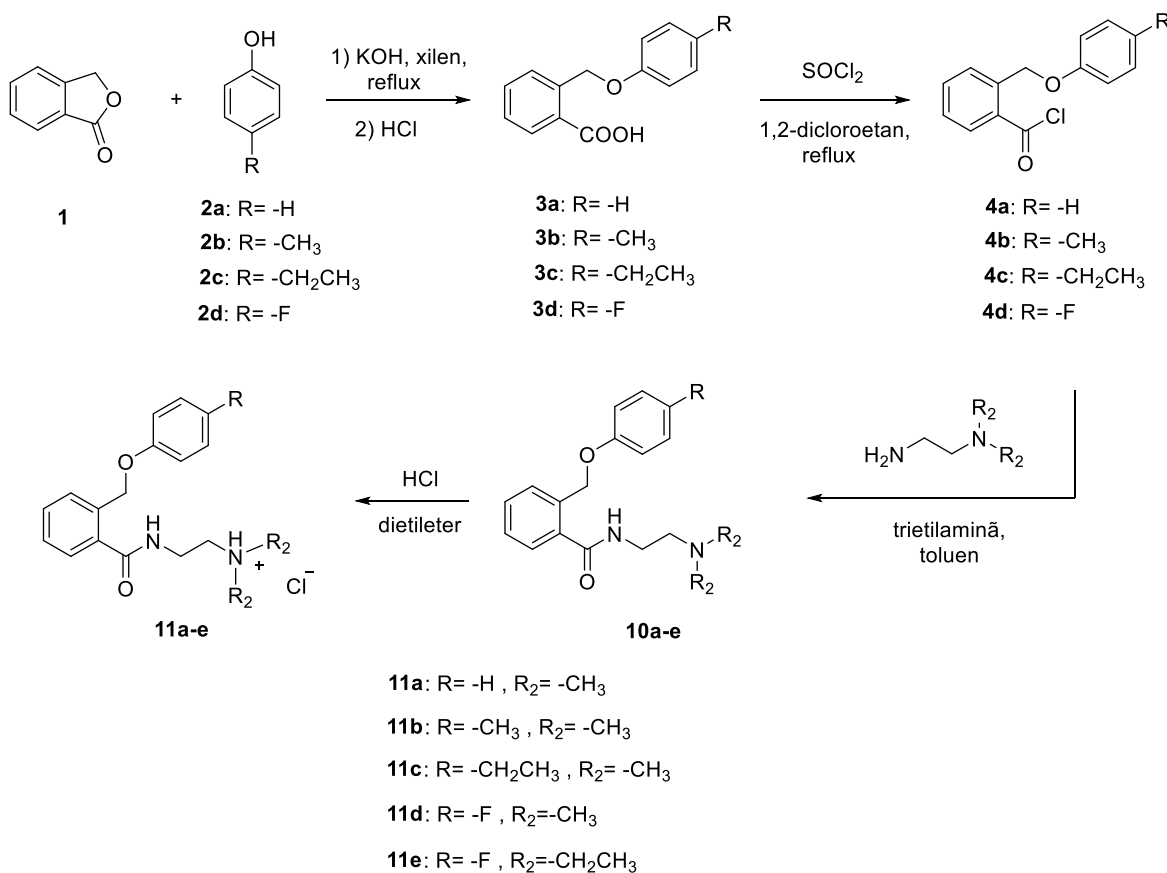
- sinteza acizilor 2-(4-R-fenoximetil)benzoici,
- sinteza clorurilor acizilor corespunzători,
- sinteza N-(2-dimetilaminoetil)-3-R₁-anilinelor,
- sinteza amidelor originale,
- sinteza clorhidraților corespunzători.



Schema 6.5. Obținerea clorhidraților N-[2-(dimetilamino)etil]-N-3-R₁-fenil-2-(4-R-fenoximetil)benzamidelor (**9**)

Acizii 2-(4-R-fenoximetil)benzoici (**3b**, **3e**) au fost obținuți în urma refluxării ftalidei (**1**) cu fenoli substituiți (**2b**, **2e**), în mediu alcalin. Acizii sunt transformați în clorurile corespunzătoare (**4b**, **4e**) prin tratare cu clorură de tionil, folosind ca mediu de reacție 1,2-dicloroetan anhidru. După îndepărtarea excesului de clorură de tionil și a solventului, clorurile acizilor se folosesc ca atare. N-(2-dimetilaminoetil)-3-R₁-anilinele (**7a-c**) se obțin prin alchilarea anilinei sau a anilinei substituite (**5a-c**) cu clorhidrat de N-(2-cloroetil)-N,N-dimetilamină (**6**), în toluen anhidru și în prezența carbonatului de sodiu, ca bază. Prin cuplarea clorurilor acizilor 2-(4-R-fenoximetil)benzoici (**4b**, **4e**) cu N-(2-dimetilaminoetil)-3-R₁-aniline (**7a-c**), în toluen anhidru, în prezență de trietilamină, se obțin amidelile originale (**8a-d**). Pentru transformarea amidelilor originale în clorhidrați (**9a-d**), acestea se tratează cu soluție suprasaturată de acid clorhidric în eter etilic. Compușii finali (**9a-d**) se purifică prin recristalizare din acetat de etil.

A doua serie de compuși este cea reprezentată de clorhidrații N-[2-di-R₂-amino)etil]-2-(4-R-fenoximetil)benzamidelor (**11a-e**), care se obțin folosind o metodă similară, descrisă în Schema 6.6.



Schema 6.6. Obținerea clorhidraților N-[2-di-R₂-amino)etil]-2-(4-R-fenoximetil)benzamidol

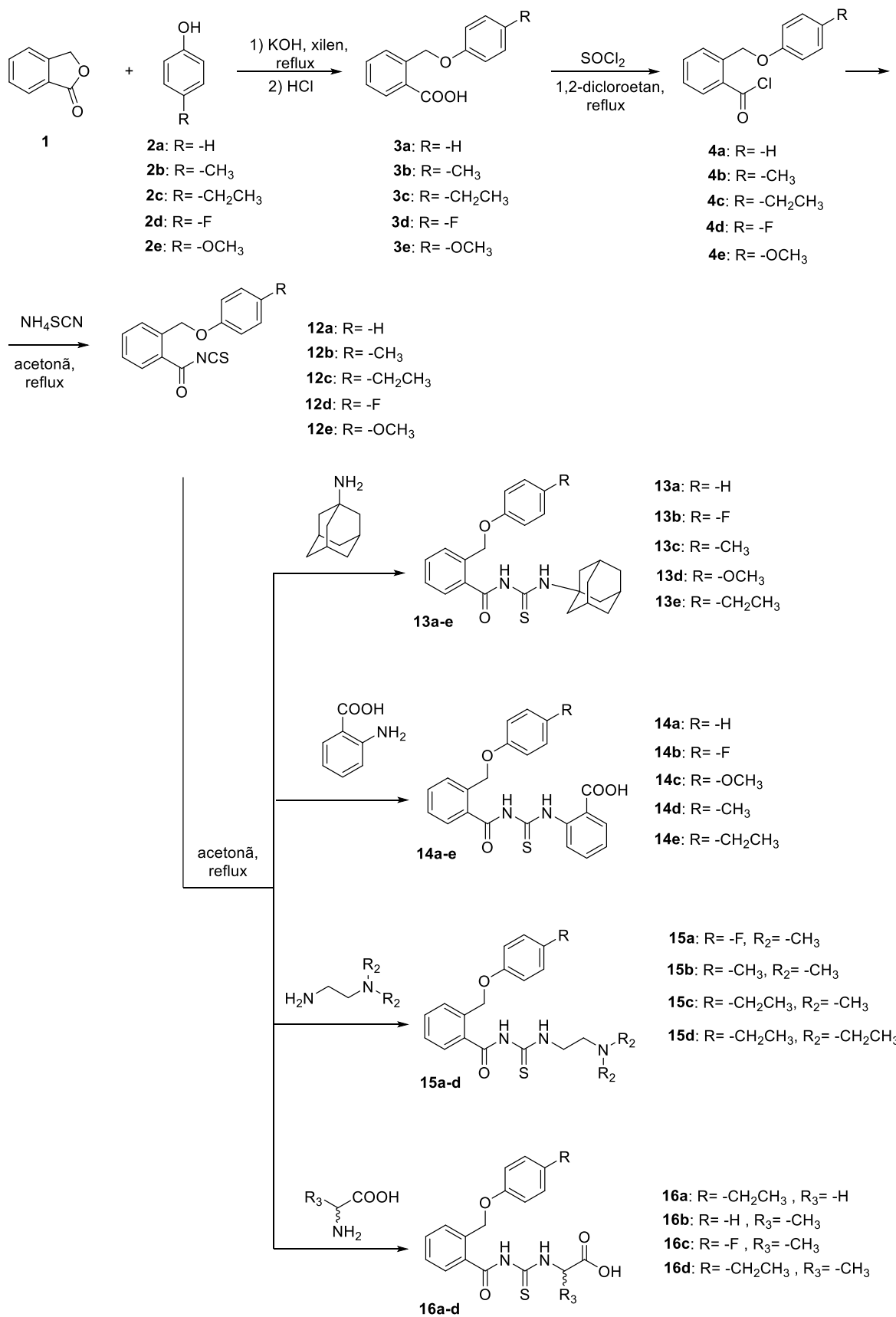
Clorurile acizilor 2-(4-R-fenoximetil)benzoici (**4a-d**) sunt cuplați cu N,N-di-R₂-etilendiamina, folosind toluenul anhidru ca mediu de reacție, în prezența trietilaminei. N-[2-di-R₂-amino)etil]-2-(4-R-fenoximetil)benzamidele (**10a-e**) astfel obținute sunt transformate în clorhidrați (**11a-e**) prin tratare cu soluție suprasaturată de acid clorhidric în eter etilic. Compușii **11a-e** rezultați sunt purificați prin recristalizare din acetat de etil.

N-(1-Adamantylcarbamotioil)-2-((4-R-fenoxi)metil)benzamidele (**13a-e**), acizii 2-(3-(2-((4-R-fenoxi)metil)benzoil)tioureido)benzoici (**14a-e**), N-((2-(di-R₂-amino)etil)carbamotioil)-2-((4-R-fenoxi)metil)benzamidele (**15a-d**), ((2-((4-etilfenoxi)metil)benzoil)carbamotioil)glicina (**16a**), ((2-((4-R-fenoxi)metil)benzoil)-

carbamotioil)alaninele (**16b-d**) au fost sintetizate printr-o metodă eficientă în 4 etape (Schema 6.7.) [48]:

- sinteza acizilor 2-(4-R-fenoximetil)benzoici,
- sinteza clorurilor acizilor corespunzători,
- sinteza izotiocianaților de 2-(4-R-fenoximetil)benzoil,
- sinteza carbamotioil-benzamidelor originale.

Clorurile acizilor 2-(4-R-fenoximetil)benzoici (**4**) se obțin conform metodelor descrise anterior. Prin refluxare timp de o oră cu tiocianat de amoniu, în acetonă anhidră, acestea sunt transformate în izotiocianți de 2-(4-R-fenoximetil)benzoil (**12**), care nu se izolează. Se adaugă apoi componenta aminică: 1-aminoadamantan, acid antranilic, N,N-di-R₂-etilendiamina, DL-alanină sau glicocol și se refluxează timp de 8 ore. Compușii **13a-e**, **14a-e**, **15a-d**, **16a-d** astfel rezultați sunt purificați prin recristalizare.



Schema 6.7. Obținerea carbamothioil-benzamidelor **13a-e**, **14a-e**, **15a-d**, **16a-d**

Capitolul 7. Dovedirea structurii chimice și a purității compușilor sintetizați

Dovedirea structurii chimice și a purității noilor amide ale acizilor 2-(4-R-fenoximetil) benzoici a fost determinată prin diferite metode spectrale: spectrometria în infraroșu (IR), spectrometria de rezonanță magnetică nucleară $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$ și spectrometria de masă de înaltă rezoluție (HRMS = High Resolution Mass Spectrometry). Înregistrarea și interpretarea spectrelor de infraroșu și RMN au fost realizate în colaborare cu Centrul de Chimie Organică al Academiei Române "C.D. Nenițescu", București. Înregistrarea spectrelor HRMS au fost realizate la Institut für Organische Chemie, Technische Universität Berlin.

Capitolul 8. Determinarea activității antimicrobiene a noilor compuși

Ațiunea antimicrobiană a noilor amide a fost determinată prin 3 metode: metoda difuzimetrică pe mediu agarizat, metoda microdiluțiilor seriale în bulion prin utilizarea a două protocoale diferite (protocol A, protocol B) și metoda microtitrării biofilmului microbial.

Testele s-au realizat utilizând **8** tulpini microbiene **Gram-pozitive**: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305, *Enterococcus faecalis* ATCC VA-R17, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus subtilis* DSM10, *Micrococcus luteus* DSM1790, **7** tulpini microbiene **Gram-negative**: *Escherichia coli* ATCC 29252, *Escherichia coli* BW25113, *Escherichia coli* DSM1116, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 40, *Acinetobacter baumannii* ATCC 230, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* TA100 și **2** tulpini **fungice**: *Cryptococcus neoformans* ATCC 204092 și *Candida albicans* ATCC 10231.

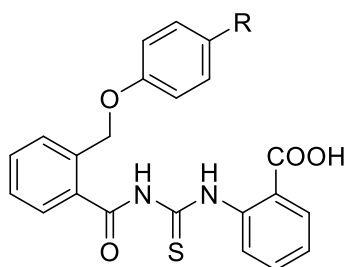
Compușii din seria clorhidraților N-[2-(dimetilamino)etil]-N-3-R₁-fenil-2-(4-R-fenoximetil)benzamidelor (**9a-d**) au avut o activitate antimicrobină redusă, cel mai activ din această serie fiind **9b**, față de tulpinile bacteriene Gram-pozitive de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus saprophyticus* și fungice (*Cryptococcus neoformans*).

Reprezentantul cel mai activ din seria clorhidraților N-[2-di-R₂-amino)etil]-2-(4-R-fenoximetil)benzamidelor (**11a-e**) a fost **11c**, față de tulpinile de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* și *Candida albicans*.

Compușii din seria N-(1-Adamantilcarbamoil)-2-((4-R-fenoxi)metil)benzamidele (**13a-e**) nu au prezentat acțiuni antimicrobiană față de microorganismele testate, probabil din cauza hidrofobicității accentuate conferite de restul de adamantan.

În schimb, compușii din seria acizilor 2-(3-(2-((4-R-fenoxi)metil)benzoil)tioureido)benzoici (**14a-e**) au prezentat o bună acțiune antimicrobiană, remarcându-se compușii **14a**, **14b**, **14c**, **14d** și **14e**, cu valori CMI foarte mici de 9-19 μg/mL față de tulpina de *Staphylococcus aureus*, și de 64 -128 μg/mL față de cele de *Micrococcus luteus* și *Bacillus subtilis* (Tabel VIII.11.). Acești compuși au prezentat de asemenea un efect inhibitor semnificativ față de biofilmul stafilococic, cu CMEB de 9-19 μg/mL.

Tabel VIII.11. Valorile CMI (μg/mL) pentru compușii **14a-e**



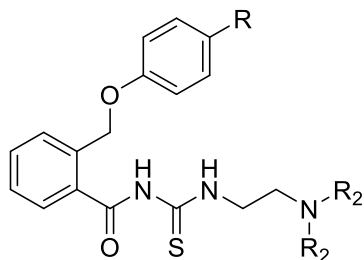
- 14a: R= -H
- 14b: R= -F
- 14c: R= -OCH₃
- 14d: R= -CH₃
- 14e: R= -CH₂CH₃

| Compus | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | <i>C. albicans</i> ATCC 10231 |
|------------|--------------------------------|----------------------------------|------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| 14a | 19 | 625 | 1250 | 1250 | 625 |
| 14b | 19 | 5000 | 1250 | 1250 | 625 |
| 14c | 9 | 1250 | 1250 | 1250 | 625 |
| 14d | 19 | 1250 | 1250 | 1250 | 1250 |
| 14e | 9 | 1250 | 1250 | 1250 | 625 |

Deși în *screening*-ul calitativ prin metoda difuzimetrică compușii din seria N-((2-(di-R₂-amino)etil)carbamoil)-2-((4-R-fenoxi)metil)benzamidelor (**15a-d**) au avut o activitate antimicrobiană redusă, la testele cantitative, compusul **15c** a prezentat valori CMI de 19 μg/mL față de tulpina de *Staphylococcus aureus*, de 64 μg/mL în cazul tulpinii de *Micrococcus luteus* și de 128 μg/mL față de cea de *Salmonella typhimurium*, iar **15d** a prezentat o valoare CMI de 39μg/mL pentru tulpina de *Staphylococcus aureus* și de 64 μg/mL în cazul *Micrococcus luteus*. Cei doi compuși au prezentat de asemenea cea mai bună

activitate antifungică, cu o valoare CMI de 79 $\mu\text{g/mL}$ față de tulpina de *Candida albicans* și anti-biofilm stafilococic cu valori CMEB de 9-19 $\mu\text{g/mL}$ (Tabel VIII.12.).

Tabel VIII.12. Valorile CMI ($\mu\text{g/mL}$) pentru compușii **15a-d**



15a: R= -F, R₂= -CH₃

15b: R= -CH₃, R₂= -CH₃

15c: R= -CH₂CH₃, R₂= -CH₃

15d: R= -CH₂CH₃, R₂= -CH₂CH₃

| Compus | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | <i>C. albicans</i> ATCC 10231 |
|------------|--------------------------------|----------------------------------|------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| 15a | 1250 | 5000 | 1250 | 1250 | 312 |
| 15b | 78 | 5000 | 1250 | 625 | 312 |
| 15c | 19 | 5000 | 1250 | 1250 | 78 |
| 15d | 39 | 5000 | 1250 | 625 | 78 |

Compușii din seria ((2-((4-etilfenoxi)metil)benzoil)carbamotioil)glicinei (**16a**) și ((2-((4-R-fenoxi)metil)benzoil)-carbamotioil)alaninei (**16b-d**) au prezentat acțiune antimicrobiană redusă, cu diametre de inhibiție sub 10 mm, iar valorile CMI cuprinse între 135 și 312 $\mu\text{g/mL}$, doar în cazul tulpinii de *Staphylococcus aureus*.

Putem concluzia că în urma *screening*-ului antimicrobian am identificat **6** compuși cu acțiune antistafilococică bună și foarte bună, respectiv **14c, 14e, 14a, 14b, 14d,** și **15c** cu valori CMI și CMEB de 9-19 $\mu\text{g/mL}$. Astfel, modulările structurale ale acizilor 2-(4-R-fenoxi-metil)benzoici au condus la obținerea unor derivați cu acțiune antimicrobiană bună *in vitro*, ceea ce-i recomandă pentru testarea în modele de infecție *in vivo*.

Capitolul 9. Determinarea citotoxicității *in vitro*

Determinarea citotoxicității reprezintă o etapă importantă în dezvoltarea unui medicament, fiind abordată în studiul nostru prin teste *in vitro*, pe o linie celulară standardizată, respectiv linia Hep-2 (carcinom laringian uman), recomandată pentru realizarea acestor determinări.

Testele de citotoxicitate s-au realizat pentru un număr de 18 compuși originali, la patru concentrații (12,5 µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL și 100µg/mL).

Rezultatele obținute indică faptul că noile amide au prezentat citotoxicitate redusă sau moderată la concentrațiile analizate. Dintre compușii testați, N-((2-(di-R₂-amino)etil)carbamotioil)-2-((4-R-fenoxi)metil)benzamidele (**15a-d**), ((2-((4-etilfenoxi)metil)benzoil)carbamotioil)glicina (**16a**) și ((2-((4-R-fenoxi)metil)benzoil)-carbamotioil)alaninele (**16b-d**) au avut citotoxicitatea cea mai redusă.

Compușii cu acțiune antimicrobiană bună identificați anterior, respectiv **14c** și **15c** nu au fost citotoxici la concentrațiile la care au fost activi, prezentând așadar un profil sigur, care îi recomandă pentru cercetări viitoare, în vederea dezvoltării de noi agenți antimicrobieni (Tabel IX.5).

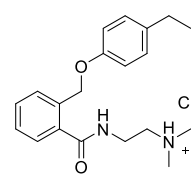
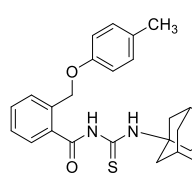
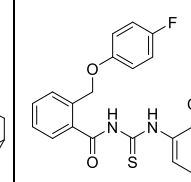
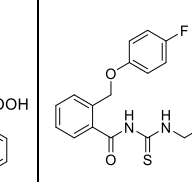
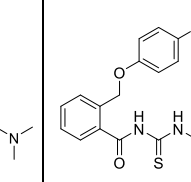
Tabel IX.5. Profilul citotoxic al compușilor cu activitate antimicrobiană pe tulpina de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

| Cod compus | CMI (µg/mL) | Viabilitate celulară (%) | |
|------------|-------------|--------------------------|------------|
| | | 25 µg/mL | 12,5 µg/mL |
| 14a | 19 | 95,32 | 100 |
| 14b | 19 | 77,35 | 90 |
| 14c | 9 | 100 | 100 |
| 14d | 19 | 82,2 | 100 |
| 14e | 9 | 73,72 | 88 |
| 15c | 19 | 100 | 100 |

Capitolul 10. Cercetări farmacologice asupra noilor amide ale acizilor 2-(4-R-fenoxi-metil)benzoici

Compușii analizați în studiul farmacologic au fost aleși pe baza diversității lor structurale, fiecare aparținând unei clase diferite de compuși sintetizați: **11c**, **15a**, **16c**, **14b** și **13c** (Tabel X.1).

Tabel X.1. Formula de structură a compușilor analizați în studiul farmacologic

| Cod compus | 11c | 13c | 14b | 15a | 16c |
|----------------------|---|---|---|--|---|
| Formula de structură |  |  |  |  |  |

Determinarea toxicității acute s-a realizat prin metoda *up-and-down*, în conformitate cu Ghidurile Europene actuale care țin cont de principiile de etică în cercetarea pe animale vertebrate vii. Valoarea **DL₅₀** a fost estimată în intervalul **500-2000 mg/kg corp**, iar în acest sens cei cinci noi compuși pot fi încadrați în categoria 4 de toxicitate – “periculos dacă este înghițit”, conform Sistemului Global Armonizat de clasificare a substanțelor cu potențial de toxicitate [49].

Pentru cercetările ulterioare, dozele au fost alese din intervalul 1/20-1/10 DL₅₀, respectiv 25-50 mg/kg corp.

Potențialul analgezic al noilor compuși a fost evaluat în două modele de durere: nociceptivă și viscerală. Sensibilitatea dureroasă termică a fost determinată prin testul hot plate (53°C) și sensibilitatea dureroasă indusă a fost determinată printr-un stimul chimic (acid acetic 0,6% i.p.). Ca referințe au fost alese un analgezic cu mecanism mixt opioid și monoaminergic spinal (tramadol, 30 mg/kg corp) și un antiinflamator nesteroidian (diclofenac, 10 mg/kg corp).

În urma evaluării sensibilității dureroase termice prin testul **hot plate (53°C)** s-au obținut următoarele rezultate:

- Pentru loturile tratate cu tramadol (30 mg/kg corp), **11c** (50 mg/kg corp), **15a** (50 mg/kg corp) și **14b** (50 mg/kg corp) se înregistrează efect analgezic vs. pre-tratament prin creșterea latenței apariției primului semn de durere după 30, 60, respectiv 120 de minute după doză unică (Fig. 10.3.).

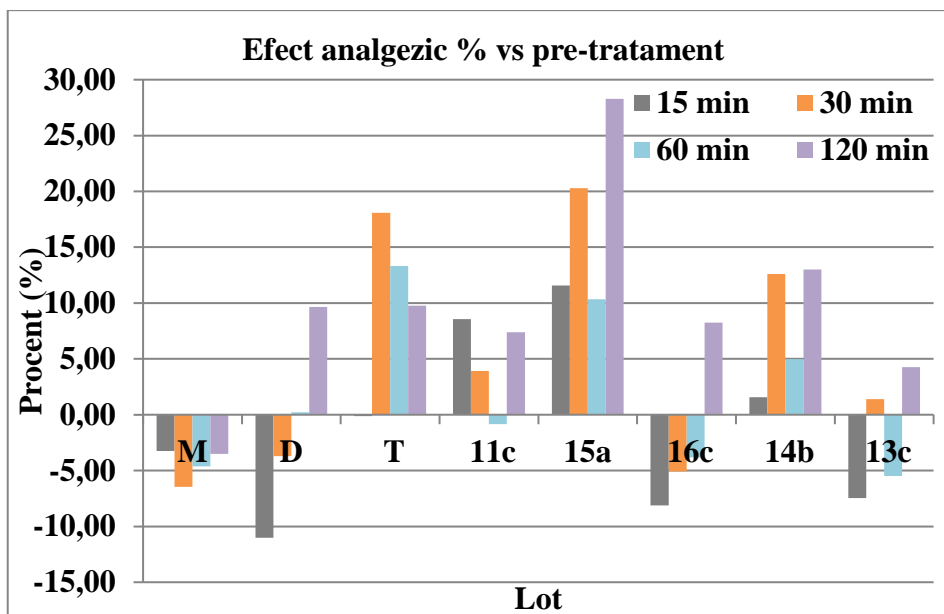


Fig. 10.3. Efectul analgezic maxim posibil (%) al primului semn de durere vs. pre-tratament în testul hot plate pentru loturile M, D, T, 11c, 15a, 16c, 14b și 13c

- Tramadolul 30 mg/kg corp prezintă efect analgezic maxim 24,53% vs. lot martor ($p < 0,005$), după 30 de minute de la administrarea per os. Efect analgezic se observă și după 60 min. (17,95% vs. lot M, ns) și 120 min (13,26 % vs. lot M, ns), dar este mai redus (Fig. 10.4.).

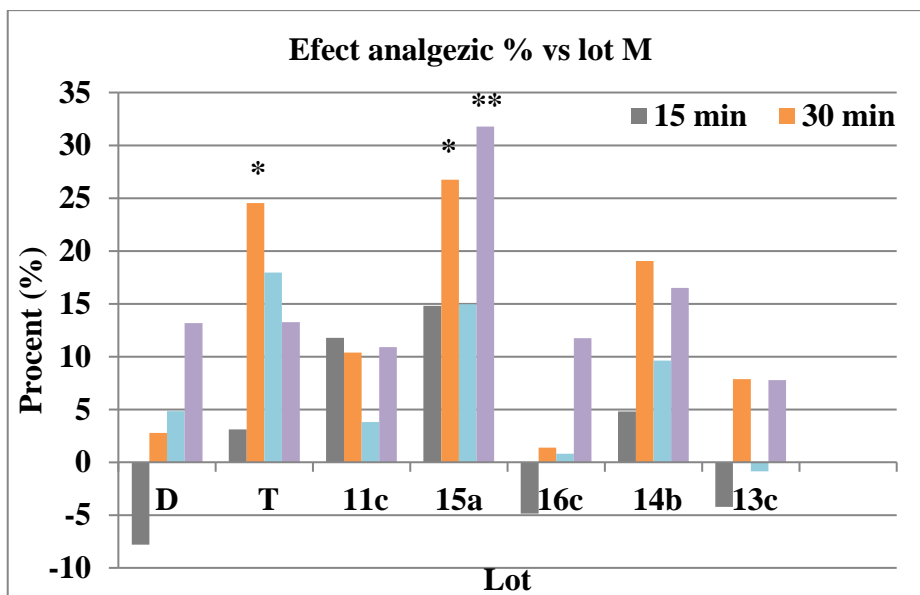


Fig. 10.4. Efectul analgezic (%) al diclofenacului, tramadolului și al substanțelor nou sintetizate 11c, 15a, 16c, 14b, 13c vs. lotul martor în testul hot plate

- Pentru tratamentul cu diclofenac (10 mg/kg corp) se observă un efect analgezic vs. lotul martor de 13,17% (ns) după 120 de minute (Fig. 10.4.).
- Compusul **15a** în doză unică (50 mg/kg corp) prezintă efect analgezic vs. lotul martor după 15 minute (14,81%, ns), 30 minute (26,75%, $p < 0,005$), 60 minute (14,95 %, ns) și 120 minute (31,78%, $p < 0,001$) (Fig. 10.4.). Evoluția și intensitatea efectului analgezic sunt superioare tramadolului.
- Compusul **14b** prezintă efect analgezic față de lotul martor în special după 30 minute (19,09%, ns) și 120 minute (16,51%, ns) (Fig. 10.4.).
- Compusul **11c** prezintă efect analgezic redus vs. lotul martor după 15 minute (11,79%, ns), 30 minute (10,38%, ns), și 120 minute (10,90%, ns) (Fig. 10.4.).
- Compusul **16c** prezintă efect analgezic redus după 120 minute (11,76%, ns) (Fig. 10.4.).
- Compusul **13c** prezintă efect analgezic redus după 30 minute (7,87%, ns) și după 120 minute (7,77%, ns) (Fig. 10.4.).

În urma evaluării sensibilității dureroase în **testul stimulului chimic** (acid acetic 0,6%, i.p.) s-au obținut următoarele rezultate:

- Pentru lotul martor a fost înregistrată o valoare medie de $57 \pm 11,03$, numărul cel mai mare de contorsiuni.
- Tratamentul cu tramadol (30 mg/kg corp) a redus semnificativ statistic numărul de contorsiuni, efectul analgezic fiind de 84,39% ($p < 0,0001$) (Fig. 10.6.).

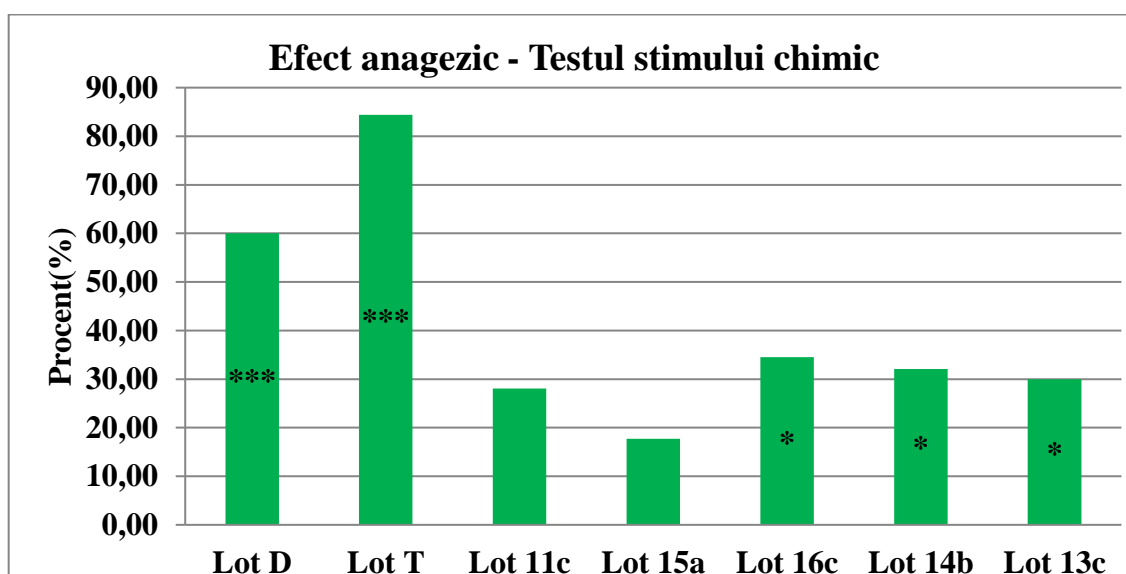


Fig. 10.6. Efectul analgezic față de lotul martor exprimat prin reducerea procentuală a numărului de contorsiuni pentru loturile tratate cu tramadol (T), diclofenac (D) și substanțele nou sintetizate, evidențiat în testul stimulului chimic.

- Tratatamentul cu diclofenac (10 mg/kg corp) a redus semnificativ statistic numărul de contorsiuni, efectul analgezic fiind de 60,00% ($p < 0,0001$) (Fig. 10.6.).
- Compușii **11c** și **15a** au redus numărul de contorsiuni comparativ cu lotul martor, efectul analgezic înregistrat este nesemnificativ statistic 28,07 % (ns), respectiv 17,72 (ns) (Fig. 10.6.).
- Pentru compușii **16c**, **14b** și **13c** se înregistrează efect analgezic prin reducerea numărului de contorsiuni față de lotul martor cu 34,5% ($p < 0,005$); 32,11% ($p < 0,005$); respectiv 30,00% ($p < 0,005$) (Fig. 10.6.), însă efectul este inferior celui indus de tramadol și diclofenac.

Capitolul 11. Studii de docking molecular

Rezultatele studiului de docking molecular indică o corelație pozitivă între structura noilor compuși sintetizați și afinitatea pentru receptorul nociceptinei, asemănarea structurală cu compusul JTC-801 fiind benefică (Fig. 11.4.).

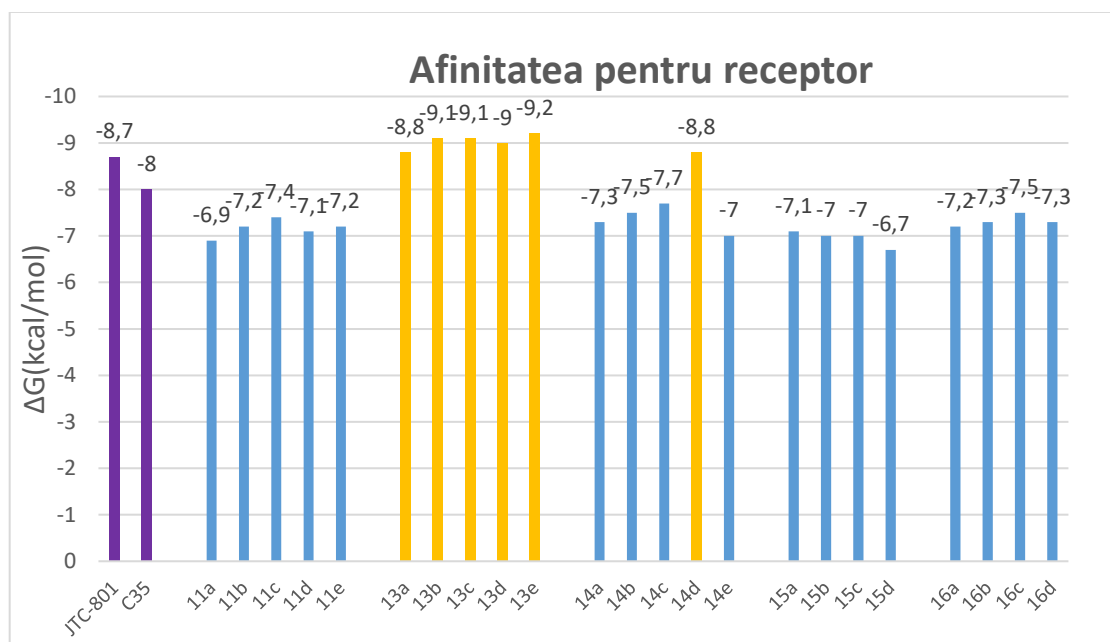


Fig. 11.4. Energiile libere de legare (ΔG , kcal/mol) pentru compușii analizați în studiul de docking

Prin modulări structurale, introducerea unui nucleu de adamantan, am obținut o serie de compuși **13a-e** cu afinitate față de receptorul nociceptinei superioară substanțelor de referință.

Legarea de receptorul nociceptinei este favorizată de un număr mai mare de interacțiuni (JTC-801, **13e**, **13c**), principalele tipuri de interacțiuni fiind de tip legături de hidrogen și legături hidrofobe (pi-sigma, alchil și pi-alchil). Principalii aminoacizi implicați în crearea legăturilor sunt: TYR131, VAL283, ILE219 și PHE215 (Fig. 11.7., 11.8.).

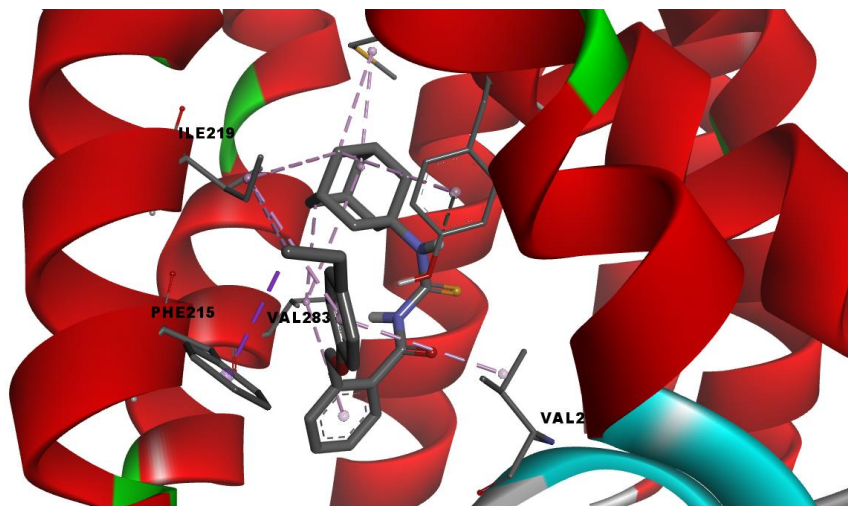


Fig. 11.7. Docarea compusului **13e** în receptorul nociceptinei

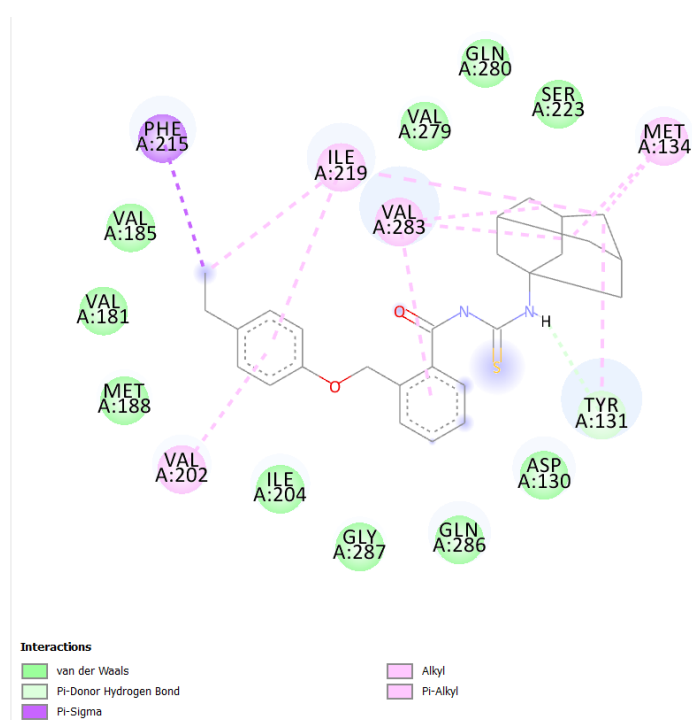


Fig. 11.8. Interacțiuni intermoleculare precise pentru **13e**

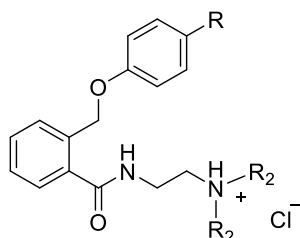
Astfel este confirmat potențialul acestor noi compuși pentru acțiunea analgezică, studii biologice suplimentare fiind însă necesare.

Capitolul 12. Determinarea profilului ADMET prin metode *in silico*

Evaluarea profilului ADMET s-a realizat cu ajutorul metodelor *in silico*, folosind software-ul ADMET Predictor™, versiunea 8.0.4.6. (Simulation Plus Inc., Lancaster, California, SUA).

Într-o primă etapă a fost determinat caracterul *drug-like* al derivaților de acizi 2-(4-R-fenoxi-metil)benzoic. Cei 6 descriptori moleculari analizați **Mr**, **MlogP**, **HBD**, **HBA**, **TPSA** și **RNB** se încadrează în limitele impuse de regulile Lipinski și Veber, compușii având astfel un caracter *drug-like* optim (Tabel XII.1.).

Tabel XII.1. Proprietățile *drug-like* ale compușilor **11a-e**



11a: R= -H, R₂= -CH₃

11b: R= -CH₃, R₂= -CH₃

11c: R= -CH₂CH₃, R₂= -CH₃

11d: R= -F, R₂= -CH₃

11e: R= -F, R₂= -CH₂CH₃

| Compus | Mr (g/mol) | MLogP | HBD | HBA | TPSA (Å ²) | RBN |
|------------|------------|-------|-----|-----|------------------------|-----|
| 11a | 334,84 | 2,718 | 2 | 4 | 42,77 | 7 |
| 11b | 348,87 | 2,951 | 2 | 4 | 42,77 | 7 |
| 11c | 362,9 | 3,178 | 2 | 4 | 42,77 | 8 |
| 11d | 352,83 | 3,103 | 2 | 4 | 42,77 | 7 |
| 11e | 380,89 | 3,558 | 2 | 4 | 42,77 | 9 |

Profilul farmacocinetic al compușilor **11a-e** este caracterizat printr-o solubilitate bună în apă și permeabilitate mare prin membranele biologice. Din punct de vedere farmacotoxicologic, compușii au un potențial toxic redus, cu o probabilitate mică de a produce reacții adverse.

Compușii **13a-e** au un caracter lipofil accentuat, fapt care se reflectă în proprietățile farmacocinetice. Solubilitatea în apă a acestor compuși este redusă, permeabilitatea prin membranele biologice este mare, iar legarea de proteinele plasmatice se realizează în proporție mare. Din punct de vedere farmacotoxicologic, acești compuși posedă o toxicitate acută mare.

Compușii **14a-e** au un profil farmacocinetic caracterizat printr-o solubilitate bună în apă, cu o permeabilitate bună prin anumite membrane biologice, dar redusă prin bariera

hematoencefalică și o legarea în proporție mare de proteinele plasmatice. Din punct de vedere farmacotoxicologic există un risc de toxicitate acută mare și o hepatotoxicitate accentuată.

Pentru compușii **15a-d** profilul farmacocinetic este optim, cu o solubilitate bună în apă și permeabilitate mare prin membranele biologice. Acești compuși posedă din punct de vedere farmacotoxicologic o potențială cardiotoxicitate și hepatotoxicitate (Tabel XII.10., Tabel XII.18., Tabel XII.19).

Tabel XII.10. Proprietăți farmacocinetice ale compușilor **15a-d**

| Compus | Sw | Peff | MDCK | LogBB | BBB | Vd | RBP | F _{up} | Pgp_Substr |
|------------|-------|-------|---------|-------|------|-------|-------|-----------------|-----------------|
| 15a | 0,355 | 1,668 | 326,811 | 0,431 | Mare | 1,927 | 0,713 | 15,834 | Da (79%) |
| 15b | 0,287 | 1,772 | 282,555 | 0,235 | Mare | 1,87 | 0,704 | 15,267 | Da (73%) |
| 15c | 0,207 | 1,793 | 278,508 | 0,279 | Mare | 1,958 | 0,692 | 11,977 | Da (79%) |
| 15d | 0,159 | 1,348 | 260,84 | 0,234 | Mare | 1,953 | 0,687 | 11,331 | Da (91%) |

Legenda: valorile marcate cu roșu reprezintă depășiri ale limitelor parametrilor Sw (mg/mL) $\geq 0,010$; Peff (cm/s x 10⁴) $\geq 0,5$; MDCK (cm/s x 10⁷) ≥ 30 ; LogBB > -0,1 ; Vd (L/kg) $\leq 3,7$; RBP <1,0 ; Fup(%) >10 % [198].

Tabel XII.18. Proprietăți farmacotoxicologice ale compușilor **15a-d**

| Compus | MaxRTD | Rat_Acute | Rat_TD50 | hERG_Filter |
|------------|--------------|-----------|--------------|-----------------|
| 15a | > 3,16 (72%) | 575,723 | 15,565 | Da (63%) |
| 15b | > 3,16 (79%) | 636,777 | 7,38 | Da (65%) |
| 15c | > 3,16 (74%) | 671,677 | 7,447 | Da (76%) |
| 15d | > 3,16 (72%) | 726,655 | 8,376 | Da (79%) |

Legenda: valorile marcate cu roșu reprezintă depășiri ale limitelor parametrilor **MaxRTD** >3,16 mg/ kg corp/ zi; **Rat_Acute** >500 mg/kg corp; **Rat_TD50** >10 mg/kg corp/zi [202].

Tabel XII.19. Parametri hepatotoxici ai compușilor **15a-d**

| Compus | Ser_AlkPhos | Ser_GGT | Ser_LDH | Ser_AST | Ser_ALT |
|------------|--------------|----------------------|---------|--------------|----------------------|
| 15a | Normal (67%) | Ridicat (59%) | Normal | Normal (78%) | Ridicat (55%) |
| 15b | Normal (70%) | Ridicat (57%) | Normal | Normal (89%) | Ridicat (53%) |
| 15c | Normal (70%) | Ridicat (53%) | Normal | Normal (89%) | Ridicat (53%) |
| 15d | Normal (63%) | Normal (64%) | Normal | Normal (73%) | Ridicat (51%) |

Legenda: valorile marcate cu roșu reprezintă depășiri ale limitelor parametrilor

Derivații **16a-d** sunt caracterizați printr-o solubilitate bună în apă, dar permeabilitatea prin membranele biologice este redusă și legarea de proteinele plasmatică se realizează în proporție mare. Profilul farmacotoxicologic evidențiază un potențial hepatotoxic pentru acești compuși.

Capitolul 13. Concluzii generale

Studiile de cercetare efectuate au adus contribuții importante în clasa amidelor acizilor 2-(4-R-fenoximetil)benzoici, compuși obținuți dovedind un bun potențial farmacologic.

Obiectivele generale propuse pentru realizarea tezei au fost îndeplinite.

1. Sinteza și purificarea noilor compuși

Modulările structurale ale acizilor 2-(4-R-fenoxi-metil)benzoici au dus la sinteza a 9 benzamide și 18 carbamotioil-benzamide, compuși originali, necitați în literatura de specialitate:

- clorhidrații N-[2-(dimetilamino)etil]-N-3-R₁-fenil-2-(4-R-fenoximetil)benzamidelor (**9a-d**)
- clorhidrații N-[2-di-R₂-amino)etil]-2-(4-R-fenoximetil)benzamidelor (**11a-e**)
- N-(1-adamantilcarbamotioil)-2-((4-R-fenoxi)metil)benzamide (**13a-e**)
- acizii 2-(3-(2-((4-R-fenoxi)metil)benzoil)tioureido)benzoici (**14a-e**)
- N-((2-(di-R₂-amino)etil)carbamotioil)-2-((4-R-fenoxi)metil)benzamide (**15a-d**)
- ((2-((4-etilfenoxi)metil)benzoil)carbamotioil)glicina (**16a**) și ((2-((4-R-fenoxi)metil)benzoil)-carbamotioil)alanine (**16b-d**).

Sinteza acestor compuși s-a realizat prin metode simple și eficiente, cu consum minim de solvenți și randamente bune.

Caracterizarea din punct de vedere fizico-chimic a noilor benzamide și carbamotioil-benzamide s-a realizat prin determinarea masei moleculare, temperaturii de topire, aspectului și randamentului de reacție.

2. Dovedirea structurii chimice a compușilor sintetizați

Structura chimică a celor 27 de compuși sintetizați, intermediarii utilizați și sintezele efectuate au fost confirmate cu ajutorul rezultatelor obținute în urma analizelor realizate: spectrometria în infraroșu, spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară (^1H -RMN, ^{13}C -RMN), spectrometria de masă de înaltă rezoluție și analiza elementală.

3. Determinarea activității antimicrobiene

Acțiunea antimicrobiană a noilor amide a fost determinată prin 3 metode: metoda difuzimetrică pe mediu agarizat, metoda microdiluțiilor seriale în bulion prin utilizarea a două protocoale diferite (protocol A, protocol B) și metoda microtitrării biofilmului microbial.

În urma *screening*-ului antimicrobian am identificat 6 compuși cu acțiune antistafilococică bună și foarte bună, respectiv **14c**, **14e**, **14a**, **14b**, **14d**, și **15c** cu valori CMI și CMEB de 9-19 $\mu\text{g/mL}$. Astfel, modulările structurale ale acizilor 2-(4-R-fenoximetil)benzoici au condus la obținerea unor derivați cu acțiune antimicrobiană bună *in vitro*, ceea ce-i recomandă pentru testarea în modele de infecție *in vivo*.

4. Determinarea citotoxicității *in vitro*

Rezultatele obținute în urma testelor efectuate pe 18 dintre compuși, indică faptul că noile amide au prezentat citotoxicitate redusă sau moderată la concentrațiile analizate. Dintre compușii testați **15a-d**, **16a** și **16b-d** au avut citotoxicitatea cea mai redusă.

Compușii cu acțiune antimicrobiană bună identificați anterior, respectiv **14c** și **15c** nu au fost citotoxici la concentrațiile la care au fost activi, prezentând așadar un profil sigur, care îi recomandă pentru cercetări viitoare, în vederea dezvoltării de noi agenți antimicrobieni.

5. Cercetări farmacologice

În urma determinării toxicității acute a fost stabilit intervalul 500-2000 mg/kg corp, în care se situează DL_{50} , după administrarea orală la șoareci a celor cinci compuși.

Potențialul terapeutic al compușilor **11c**, **15a**, **16c**, **14b**, **13c** a fost evaluat în durerea nociceptivă și viscerală, cu ajutorul a două teste: hot plate (53 $^{\circ}\text{C}$) și stimulul chimic (acid acetic 0,6%). Efectul analgezic a fost determinat după doză unică, după administrarea p.o.

Compusul **15a** a prezentat cel mai intens efect analgezic în testul hot plate după 120 minute de la administrarea *per os*, dar nu a prezentat efect analgezic în testul stimulului chimic, la o doză de 50 mg/kg corp.

Compușii **16c**, **14b** și **13c**, la o doză de 50 mg/kg corp, au prezentat efect analgezic semnificativ statistic ($p < 0,005$) în testul stimulului chimic, dar acesta este mai redus decât al tramadolului și diclofenacului.

Aceste rezultate sugerează posibilitatea unor mecanisme de acțiune diferite pentru compușii testați. Astfel pentru compusul **15a** este posibil un mecanism central, iar pentru compușii **16c**, **14b** și **13c** este posibil un mecanism mixt, central și periferic.

Noii derivați de acid 2-(4-R-fenoxi-metil)benzoic **15a**, **16c**, **14b** și **13c** au potențial analgezic în reducerea durerii nociceptive și viscerale.

6. Studii de docking molecular

Rezultatele studiului de docking molecular indică o corelație pozitivă între structura noilor compuși sintetizați și afinitatea pentru receptorul nociceptinei, fapt confirmat și de studiul efectuat pe compusul JTC-801 [50], care are fragmentul structural de acid 2-(4-etilfenoxi-metil)benzoic.

Prin modulări structurale, care au constat și în introducerea unui nucleu de adamantan, am obținut o serie de compuși **13a-e** cu afinitate față de receptorul nociceptinei superioară substanțelor de referință.

Astfel este confirmat potențialul acestor noi compuși pentru acțiunea analgezică, studii biologice suplimentare fiind însă necesare.

7. Determinarea profilului ADMET prin metode *in silico*

Într-o primă etapă a fost determinat caracterul *drug-like* al derivaților de acizi 2-(4-R-fenoximetil)benzoic. Cei 6 descriptori moleculari analizați Mr, MlogP, HBD, HBA, TPSA și RNB se încadrează în limitele impuse de regulile Lipinski și Veber, compușii având astfel un caracter *drug-like* optim.

În continuare a fost determinat profilul farmacocinetic și farmacotoxicologic al derivaților de acizi 2-(4-R-fenoximetil)benzoic.

Profilul farmacocinetic cel mai bun l-au avut compușii **11a-e** și **15a-d**.

Profilul farmacotoxicologic cel mai adecvat l-au avut compușii **11a-e**, **13a-e**, **16a** și **16b-d**.

Bibliografie

1. Zhaurova K. Genetic causes of adult-onset disorders. *Nature Education* 2008, 1, 1, 49.
2. <https://www.drugbank.ca/stats> accesat la 1 Iunie 2019.
3. Mócsai A, Kovács L, Gergely P. What is the future of targeted therapy in rheumatology: biologics or small molecules? *BMC Medicine* 2014, 12, 43.
4. von Nussbaum F, Brands M, Hinzen B, Weigand S, Häbich D. Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry—Exodus or Revival? *Angewandte Chemie International Edition* 2006, 45, 5072-5129.
5. Rajamuthiah R, Fuchs BB, Conery AL, Kim W, Jayamani E, Kwon B, Ausubel FM, Mylonakis E. Repurposing Salicylanilide Anthelmintic Drugs to Combat Drug Resistant *Staphylococcus aureus*. *Plos One* 2015, 10, 4, e0124595.
6. Shinkai H, Ito T, Iida T, Kitao Y, Yamada H, Uchida I. 4-Aminoquinolines: Novel Nociceptin Antagonists with Analgesic Activity. *J Med Chem* 2000, 43, 4667-4677.
7. Oprea TI, Bologa CG, Brunak S,..., Zahoránszky-Köhalmi G. Unexplored therapeutic opportunities in the human genome. *Nature Reviews Drug Discovery* 2018, 17, 317-332.
8. Matthews H, Hanison J, Nirmalan N. “Omics”-Informed Drug and Biomarker Discovery: Opportunities, Challenges and Future Perspectives. *Proteomes* 2016, 4, 3, 2227-7382.
9. Pattabiraman VR, Bode JW. Rethinking amide bond synthesis. *Nature* 2011, 480, 471-479.
10. Montalbetti CAGN, Falque V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* 2005, 61, 10827-10852.
11. Caley CF, Weber SS. Sulpiride: an Antipsychotic with Selective Dopaminergic Antagonist Properties. *Annals of Pharmacotherapy* 1995, 29, 2, 152–160.
12. Bonnet U. Moclobemide: Evolution, Pharmacodynamic, and Pharmacokinetic Properties. *CNS Drug Reviews* 2002, 8, 283-308.
13. Hanna RG, Lampe JW, Lumma WC Jr, Erhardt PW, Wong SS, Sullivan ME. Heterocyclic analogs of benzamide antiarrhythmic agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 1989, 32, 3, 688-693.

14. Cristea AN, Negreș S, Marineci CD, Turculeț IL, Chiriță C, Brezina A, Popescu FD, Pavelescu M, Hriscu A, Dogaru MT, Vari CE, Mogoșan C, Popescu F, Țarălungă G. *Tratat de farmacologie – ediția I 2009*, Editura Medicală, București.
15. Dowling PM. Prokinetic drugs: metoclopramide and cisapride. *Can Vet J* 1995, 36, 2, 115-6.
16. Liu Y, Khawaja AM, Rogers DF. Effects of the cysteinyl leukotriene receptor antagonists pranlukast and zafirlukast on tracheal mucus secretion in ovalbumin-sensitized guinea-pigs in vitro. *British Journal of Pharmacology* 1998, 124, 563-571.
17. Kuhnhen J, Kowalski T, Steenken S et al. Procarbazine, carmustine, and vincristine (PBV) for chemotherapy pre-treated patients with recurrent glioblastoma: a single-institution analysis. *Journal of Neuro-Oncology* 2012, 109, 433.
18. Burry JN. Persistent Light Reactions From Buclosamide. *Arch Dermatol* 1970, 101, 1, 95-97.
19. Campbell WC. The chemotherapy of parasitic infections. *The Journal of parasitology* 1986, 72, 1, 45-61.
20. Kumar A, Narasimhan B, Kumar D. Synthesis, antimicrobial, and QSAR studies of substituted benzamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2007, 15, 12, 4113-4124.
21. McVay CS, Rolfe RD. In Vitro and In Vivo Activities of Nitazoxanide against *Clostridium difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000, 44, 9, 2254-2258.
22. Wall MD, Oshin M, Chung GAC, Parkhouse T, Gore A, Herreros E, Cox B, Duncan K, Evans B, Everett M, Mendoza A. Evaluation of N-(phenylmethyl)-4-[5-(phenylmethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-4-yl]benzamide inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* growth. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2007, 17, 10, 2740-2744.
23. Fukai R, Zheng X, Motoshima K, Tai A, Yazama F, and Kakuta H. Design and Synthesis of Novel Cyclooxygenase-1 Inhibitors as Analgesics: 5-Amino-2-ethoxy-N-(substituted-phenyl)benzamides. *ChemMedChem* 2011, 6, 550-560.
24. Moradei OM, et al. Novel Aminophenyl Benzamide-Type Histone Deacetylase Inhibitors with Enhanced Potency and Selectivity. *Journal of Medicinal Chemistry* 2007, 50, 23, 5543-5546.

25. Saeed S, Rashid N, Jones PG, Ali M, Hussain R. Synthesis, characterization and biological evaluation of some thiourea derivatives bearing benzothiazole moiety as potential antimicrobial and anticancer agents. *Eur J Med Chem* 2010, 45, 1323–1331.
26. Saeed A, Shaheen U, Hameed A, Haider Naqvi SZ. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of some new 1-(fluorobenzoyl)-3-(fluorophenyl)thioureas. *Journal of Fluorine Chemistry* 2009, 130, 1028–1034.
27. Duan L-P, Xue J, Xu L-L, Zhang H-B. Synthesis 1-acyl-3-(2'-aminophenyl)thioureas as anti-intestinal nematode prodrugs. *Molecules* 2010, 15, 6941-6947.
28. Ibrahim MA, Amin NM, Sukeri M, Yusof M. Cytotoxicity of novel amino acid-thiourea derivatives on pathogenic *Acanthamoeba sp.* UMTAS 2011, Empowering Science, Technology and Innovation Towards a Better Tomorrow, LSP 104.
29. Nakisah MA, Tan JW, Mohd Shukri Y. Anti- cancer activities of several synthetic carbonylthiourea compounds on MCF- 7 cell. UMTAS 2011, Empowering Science, Technology and Innovation Towards a Better Tomorrow, LS016, 67- 73.
30. Severson WE, McDowell M, Ananthan S, Chung D-H, Rasmussen L, Sosa MI, White EL, Noah J, Jonsson CB. High-throughput screening of a 100,000-compound library for inhibitors of influenza a virus (H3N2). *J Biomol Screen* 2008, 13, 879–887.
31. Gunasekaran N, Vadivel V, Halcovitch NR, Tiekink ERT. Preparation, characterization and in vitro antioxidant and cytotoxicity studies of some 2,4-dichloro-N-[di(alkyl/aryl)carbamothioyl] benzamide derivatives. *Chemical Data Collections* 2017, 9–10, Pages 263-276.
32. Shalas AF, Andono S, Rudyanto M. Synthesis and structure-activity relationship of 1-allyl-3-(2-chlorobenzoyl) thiourea as analgesic. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2016, 8, 6.
33. Küçükgülzel ŞG, Coşkun İ, Aydın S, Gürsoy GAŞ, Çevik Ö, Özakpınar ÖB, Özsave D, Şener A, Kaushik-Basu N, Basu A, Talele TT. Synthesis and Characterization of Celecoxib Derivatives as Possible Anti-Inflammatory, Analgesic, Antioxidant, Anticancer and Anti-HCV Agents. *Molecules* 2013, 18, 3595-3614.
34. Zhang JF, Xu JY, Wang BL, Li YX, Xiong LX, Li YQ, Ma Y, Li ZM. Synthesis and Insecticidal Activities of Novel Anthranilic Diamides Containing Acylthiourea and Acylurea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2012, 60, 31, 7565-7572.

35. Wu AB, Duan LP. Transition metal complex of N-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-ylcarbamothioyl)benzamide: design, synthesis and herbicidal activity. *Journal of the Chinese Chemical Society* 2009, 56, 539- 542.
36. Ke SY, Xue SJ. Synthesis and herbicidal activity of N-(o-fluorophenoxyacetyl) thioureas derivatives and related fused heterocyclic compounds. *Arkivoc* 2006, 10, 63–68.
37. Zhang Z, Zeng Y, Jiang Z, Shu B, Sethuraman V, Zhong G. Design, synthesis, fungicidal property and QSAR studies of novel β -carboline containing urea, benzoylthiourea and benzoylurea for the control of rice sheath blight. *Pest Manag Sci* 2018, 74, 1736-1746.
38. Bonizzoni M, Fabbrizzi L, Taglietti A, Tiengo F. (Benzylideneamino)thioureas – Chromogenic Interactions with Anions and N–H Deprotonation. *Eur J Org Chem* 2006, 3567–3574.
39. Gaunt MJ, Johansson CC, McNally A, Vo NT. Enantioselective organocatalysis. *Drug Discov Today* 2007, 12, 8–27.
40. Zhao Y, Liu C, Feng M, Chen Z, Li S, Tian G, Wang L, Huang J, Li S. Solid phase extraction of uranium(VI) onto benzoylthiourea-anchored activated carbon. *J Hazard Mater* 2010, 176, 119–124.
41. Ullah I, Shah A, Khan M. Synthesis, Surface Properties, and Corrosion Inhibition of 1-Butyl-3-dodecanoylthiourea. *J Surfactants Deterg* 2016, 19, 873–877.
42. Gunasekaran N, Karvembu R. Synthesis, characterization, and catalytic applications of Ru(III) complexes containing N-[di(alkyl/aryl)carbamothioyl]benzamide derivatives and triphenylphosphine/triphenylarsine. *Inorg Chem Commun* 2010, 13, 952–955.
43. Odame F, Hosten EC, Betz R, Lobb K, Tshentu ZR. Characterization of some amino acid derivatives of benzoyl isothiocyanate: Crystal structures and theoretical prediction of their reactivity. *J Mol Struct* 2015, 1099, 38–48.
44. Butler MS, Blaskovich MA, Cooper MA. Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015. *The Journal Of Antibiotics* 2016, 70, 3, 1-22.
45. Limban C, Chifiriuc MC, Missir AV, Chiriță CI, Bleotu C. Antimicrobial Activity of Some New Thiourea Derivatives Derived from 2-(4-Chlorophenoxy)methyl)benzoic Acid. *Molecules* 2008, 13, 3, 567-580.

46. Brown DG, Boström J. Analysis of Past and Present Synthetic Methodologies on Medicinal Chemistry: Where Have All the New Reactions Gone?. *Journal of Medicinal Chemistry* 2016, 59, 10, 4443-4458.
47. **Gurgu H**, Nuta DC, Caproiu MT, Draghici C, Chifiriuc MC, Missir AV, Limban C. Synthesis and biological evaluation of new N-(2-dimethylaminoethyl)-N-((un)substituted phenyl)-2-(4-methyl/methoxy-phenoxy-methyl)benzamides. *Farmacia* 2017, 65, 4, 494-500.
48. **Gurgu H**, Ștefănescu E, Nuta DC, Caproiu MT, Dumitrascu F, Chifiriuc MC, Bleotu C, Nitulescu GM, Radulescu FS, Limban C. N-(1-adamantylcarbamothioyl)benzamides: synthesis, biological evaluation and ADME predictions. *Farmacia* 2018, 66, 6, 963-971.
49. United Nations. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, 4th revised edition, New York and Geneva, 2011.
50. Miller RL, Thompson AA, Trapella C, et al. The Importance of Ligand-Receptor Conformational Pairs in Stabilization: Spotlight on the N/OFQ G Protein-Coupled Receptor. *Structure* 2015, 23, 12, 2291–2299.

Lista cu lucrările științifice publicate și participări la proiecte

Lucrări publicate în reviste indexate ISI/BDI:

1. **Gurgu H**, Ștefănescu E, Nuta D C, Caproiu M T, Dumitrascu F, Chifiriuc M C, Bleotu C, Nitulescu G M, Radulescu F S, Limban C. N-(1-adamantylcarbamothioyl)benzamides: synthesis, biological evaluation and ADME predictions. *Farmacia* 2018, 66, 6, 963-971.
(ISI, FI = 1,527) <http://www.revistafarmacia.ro/201806/issue62018art6.html>
2. **Gurgu H**, Nuta D C, Caproiu M T, Draghici C, Chifiriuc M C, Missir A V, Limban C. Synthesis and biological evaluation of new N-(2-dimethylaminoethyl)-N-((un)substituted phenyl)-2-(4-methyl/methoxy-phenoxy-methyl)benzamides. *Farmacia* 2017, 65, 4, 494-500.
(ISI, FI = 1,527) <http://www.revistafarmacia.ro/201704/issue42017art2.html>

3. Limban C, Missir V A, Nuta D C, Caproiu M T, Morusciag L, Chirita C, Cupii A, **Gurgu H**. Advances in research of new 2-((4-ethylphenoxy)methyl)-N-(arylcabamothioyl) benzamides. *Farmacia* 2015, 63, 3, 376-380.
(ISI, FI = 1,527) <http://www.revistafarmacia.ro/201503/issue32015art10.html>

Lucrări publicate sub formă de postere sau rezumate:

1. Limban C, Missir A V, Caproiu M T, Chifiriuc M C, Bădiceanu C D, **Gurgu H**, Chirita C, Nuță D C. Synthesis and study of new antimicrobial Thiourea derivatives. *Congresul UMF Carol Davila, 29-31 Mai 2017, București, Maedica a Journal of Clinical Medicine, Vol 12, Supliment, 2017.*
2. Limban C, Grumezescu A M, Caproiu M T, Chireac I, Missir A V, Chifiriuc M C, Bădiceanu C D, **Gurgu H**, Nuță D C. A new therapeutic strategy for fungal infections treatment. *Al XVI-lea Congres National de Farmacie din Romania, Bucuresti, 28 septembrie – 1 octombrie 2016.*
3. **Gurgu H**, Limban C, Nuță D C, Missir A V - New amides of 2-phenoxyethylbenzoic acid with potential pharmacological activity – *Conferința Internațională "From Science to Guidance and Practice", București, 19-21 Octombrie 2015, ISBN 978-973-708-854-3, pagina 164.*
4. **Gurgu H**, Missir A V, Limban C, Morușciag L, Nuță D C - Chemical modulation of new thiourea derivatives with potential pharmacological activity – *19th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, Sibiu, Romania, 2-5 Septembrie 2015.*
5. **Gurgu H**, Limban C, Nuță D C, Missir A V - Novel derivatives of 2-(4-substituted-phenoxyethyl)benzoic acid with potential antimicrobial activity- *European School of Medicinal Chemistry, 28 Iunie – 3 Iulie 2015, Urbino, Italia.*
6. **Gurgu H**, Limban C, Missir A V, Nuță D C - Sinteza și caracterizarea unor noi clorhidrați de N-(2-dialchilaminoetil)-N-((ne)substituit-fenil-2-(4-metil/metoxifenoximetil)-benzamide – *Al 9-lea Congres Anual al Asociației Medicale Române, 16-18 Aprilie 2015, București, Asociația Medicală Română, Revista Medicală Română, Romanian Medical Journal, Volumul LXII, Nr. 2, Supliment 1, An 2015, pagina 69.*

Participări la proiecte

Am participat în cadrul proiectului “Cercetare doctorală de top cu finanțare europeană TOP-DOC”, contract nr.: POSDRU/187/1.5/S/156040, finanțat de la Fondul Social European, Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007 – 2013.

Am beneficiat timp de trei luni de o bursă Erasmus + pentru un *traineeship* în cadrul grupului de cercetare Prof. Roderich Süßmuth, Institut für Organische Chemie, Technische Universität Berlin, Germania.