

“Carol Davila” University of Medicine and Pharmacy Faculty of Pharmacy, Bucharest
Scientific field: Pharmacy

HABILITATION THESIS
INTERDISCIPLINARY APPROACHES IN
PHARMACOLOGY: INTEGRATING IN VIVO TESTING
AND IN SILICO METHODS FOR DRUG DISCOVERY
AND THERAPEUTIC SCREENING

CANDIDATE

Assoc. Prof. Dr. Anca Zanfirescu

2023

Universitatea de Medicină și Farmacie “Carol Davila”, Facultatea de Farmacie, București

TEZĂ DE ABILITARE
ABORDĂRI INTERDISCIPLINARE ÎN
FARMACOLOGIE: INTEGRAREA TESTĂRII IN VIVO
ȘI A METODELOR COMPUTAȚIONALE AVANSATE
PENTRU IDENTIFICAREA DE COMPUȘI ACTIVI ȘI
SCREENINGUL TERAPEUTIC AL
MEDICAMENTELOR

Candidat:

Conf. univ. Farm. Dr. Anca Zanfirescu

2023

REZUMAT

Teza mea de abilitare, intitulată „Abordări interdisciplinare în farmacologie: integrarea testării in vivo și metodelor computaționale avansate pentru identificarea de compuși activi și screeningul terapeutic al medicamentelor”, reunește cercetări personale, efectuate în ultimii 9 ani de la primirea titlului de Doctor în Științe Farmaceutice. Această teză cuprinde principalele rezultate ale muncii mele, cuprinzând atât articole științifice originale publicate în reviste listate ISI, cât și capitole de carte publicate în edituri naționale/internaționale. Cuprinde și rezultatele proiectelor de cercetare în care am fost implicată direct în perioada 2014-2023. Această teză este organizată în trei secțiuni cheie.

Primul capitol detaliază cercetările mele privind identificarea de analgezice utile în combaterea durerii cronice. Am dezvoltat un algoritm computațional de repoziționare a medicamentelor, concentrându-mă pe identificarea structurilor chimice cu potențial de a interacționa cu enzimele endogene implicate în degradarea endocannabinoizilor. Scopul a fost identificarea unei soluții terapeutice pentru managementul durerii cronice. Prin screeningul inhibitorilor cunoscuți din baza de date ChEMBL, au fost identificate proprietățile fizico-chimice ale inhibitorilor enzimatici cunoscuți. Aceste proprietăți mi-au permis să identific în continuare medicamente cu asemănări structurale cu inhibitorii cunoscuți, oferind potențiali candidați pentru cercetare și dezvoltare ulterioară. Testele in vitro și evaluarea profilului de toxicitate au condus la selectarea cetirizinei ca un potențial analgezic inhibitor al MAGL. În faza de testare in vivo, am demonstrat eficacitatea cetirizinei ca analgezic folosind un model animale de osteoartrita. Aceste rezultate marchează un progres promițător în reutilizarea medicamentelor existente pentru a gestiona durerea cronică, o provocare medicală presantă.

O altă țintă moleculară valoroasă pentru dezvoltarea de terapii analgezice eficiente împotriva durerii din osteoartrită este receptorul vaniloid de tip 1 (TRPV1). Mi-am propus să testez eficacitatea analgezică a agomelatinei, identificată prin algoritm de repurposing, în acest tip de durere utilizând un model animal de osteoartrită indusă cu reactive Freund. Deși a prezentat o

oarecare acțiune analgezică, eficacitatea agomelatinei a fost mai mică decât a tramadolului, indicând necesitatea unor îmbunătățiri structurale.

O a doua direcție importantă în cercetarea mea este reprezentată de screening-ul farmacologic al compușilor naturali și decelarea activităților lor biologice. În acest domeniu, m-am concentrat pe identificarea potențialilor agenți terapeutici cu efecte antiinfecțioase, cicatrizante, antiinflamatorii și analgezice. Am evaluat eficacitatea cicatrizantă a unor suporturi de chitosan încărcate cu extracte hidroalcoolice de *Impatiens noli-tangere* și *Symphytum officinale* într-un model animal de arsuri termice. Rezultatele au arătat că suportul de chitosan încărcat cu extracte vegetale depășește eficacitatea tratamentului convențional cu sulfadiazină de argint. Acesta a îmbunătățit semnificativ rata de contracție a plăgii, a crescut conținutul de hidroxiprolină în țesutul granular, și a redus nivelurile serice ale citokinelor inflamatorii IL-6 și TNF- α . În plus, extractul de plantă a demonstrat proprietăți antimicrobiene, în special împotriva bacteriilor precum *S. aureus*, un agent patogen comun în infecțiile rănilor de arsuri. Această cercetare arată potențialul compușilor naturali în vindecarea rănilor și combaterea infecțiilor. Investigarea acțiunii extractelor din *Impatiens noli-tangere* și *Stachys officinalis*, precum și din alte plante autohtone românești, inclusiv *Arctium lappa*, *Veronica persica* și *Juniperus communis*, a demonstrat că acestea posedă activități antioxidante și antiinflamatorii semnificative.

Extractele naturale provenite din diverse surse, cum ar fi plantele și fungii, conțin compuși bioactivi cu capacitatea de a inhiba sau distruge diferiți agenți patogeni. Am făcut parte dintr-o echipă care a încercat să identifice inhibitori ai sortazei A (SrtA), enzimă constituentă a unor bacterii patogene rezistente. Am dezvoltat un set de reguli de clasificare pentru a prezice și a analiza potențialii inhibitori SrtA folosind descriptorii moleculari și nuclee structurale, identificând candidați promițători precum miricetina. Utilizarea docării moleculare ne-a permis să înțelegem modul interacțiunilor dintre substanțele identificate ca inhibitori și ținta moleculară, SrtA. Dincolo de SrtA, ne-am extins cercetările pentru a identifica inhibitorii de colagenază, oferind noi opțiuni terapeutice pentru combaterea infecțiilor bacteriene.

O a treia direcție de cercetare se referă la investigarea influenței dietei și nutrienților asupra sănătății și diverselor stări patologice. Alegerile dietetice afectează în mod semnificativ procesele metabolice și stresul oxidativ, având un impact asupra stării de sănătate generală. Am explorat potențialul unor alimente funcționale sau derivați, incluzând extractul de *Boletus edulis*, curcumina, resveratrolul și vitamina E, în modularea unor căi fiziologice. Acești compuși s-au

dovedit candidați promițători pentru prevenirea și tratarea bolilor cronice, inclusiv obezitatea, diabetul, afecțiunile cardiovasculare, tulburările neurodegenerative și cancerul. Mai mult, aceste alimente funcționale interacționează cu microbiota intestinală, subliniind importanța lor în strategiile holistice de sănătate.

Al doilea capitol al prezentei teze se concentrează pe activitatea mea academică și realizările profesionale, evidențiind contribuțiile mele substanțiale în sfera academică și profesională și subliniind implicarea mea în farmacologie și mediul academic.

Capitolul final oferă perspective asupra strategiilor și perspectivelor mele viitoare pentru dezvoltarea personală și a carierei, subliniind angajamentul meu față de excelența în domeniul farmacologiei.

În concluzie, cercetările mele au adus contribuții semnificative în domeniul analgeziei, repurposing medicamentos, explorarea eficacității compușilor naturali în boli cronice și împotriva bacteriilor patogene rezistente la antibiotice. Aceste descoperiri au aplicații practice în gestionarea durerii cronice, tratamentul bolilor infecțioase și îmbunătățirea stării generale de sănătate.

ABSTRACT

My habilitation thesis, titled "Interdisciplinary approaches in Pharmacology: Integrating in vivo testing and in silico methods for drug discovery and therapeutic screening," represents nine years of research following the attainment of my Doctor of Medical Sciences in Pharmacy. This comprehensive thesis encompasses original scientific articles published in ISI-listed journals, as well as volume chapters in national and international publishing houses. It synthesizes the results of my research and active participation in projects spanning from 2014 to 2023 and is organized into three key chapters.

The first chapter details my research on pain management and analgesia. I developed a computational drug repurposing algorithm, focusing on the identification of chemical structures with potential to interact with endogenous enzymes involved in the degradation of endocannabinoids. The goal was to address chronic pain management. By screening known inhibitors from the ChEMBL database, the physicochemical properties of enzymatic inhibitors were identified. These properties further allowed me to identify drugs with structural resemblances to known inhibitors, offering potential candidates for further research and development in chronic pain management. Subsequent in vitro testing and safety assessments led to the selection of cetirizine as a potential effective MAGL inhibitor. In the in vivo testing phase, I demonstrated cetirizine's efficacy as an analgesic in animal models of osteoarthritis, shedding new light on its potential as a pain-relief agent. This development marks a promising advancement in repurposing existing drugs to manage chronic pain, a pressing medical challenge.

Another valuable target for developing effective analgesic therapies against osteoarthritis pain is the transient receptor potential channel vanilloid type 1 (TRPV1). I aimed to test the effectiveness of agomelatine, identified through drug repurposing, in reducing pain associated with osteoarthritis in a rat model. While it exhibited some promise, its analgesic efficacy was lower than tramadol, indicating room for improvement. These findings contribute to the ongoing efforts in pain management and highlight the significance of TRPV1 modulation in relieving pain.

A second important direction in my research is represented by the pharmacological screening of natural compounds and their biological activities. Within this area, I focused on identifying potential therapeutic agents with anti-infective, healing, anti-inflammatory, and analgesic effects. I assessed the healing efficacy of chitosan supports containing hydroalcoholic extracts from *Impatiens noli-tangere* and *Symphytum officinale* in a rat burn wound model. The results revealed that the chitosan support containing a specific mixed extract outperformed conventional silver sulfadiazine treatment. It significantly improved the rate of wound contraction, increased hydroxyproline content in granular tissue, and reduced serum levels of inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α . Additionally, the plant extract displayed antimicrobial properties, particularly against bacteria like *S. aureus*, a common pathogen in burn wound infections. This research showcases the potential of natural compounds in wound healing and combating infections.

Exploration of extracts from *Impatiens noli-tangere* and *Stachys officinalis*, and other native Romanian plants, including *Arctium lappa*, *Veronica persica*, and *Juniperus communis*, revealed that they possess significant antioxidant and anti-inflammatory activities.

Natural extracts sourced from various origins, such as plants and fungi, contain bioactive compounds with the capability to inhibit or destroy various pathogens. I was part of a team trying to identify inhibitors of the molecular target sortase A (SrtA), found in pathogenic bacteria. We developed a set of classification rules to predict and screen potential SrtA inhibitors using molecular descriptors and chemical scaffolds, identifying promising candidates like myricetin. Our use of computational docking algorithms deepened our understanding of the molecular interactions responsible for the inhibitory activity of these compounds. Beyond SrtA, we expanded our research to identify collagenase inhibitors, offering new therapeutic options for addressing bacterial infections.

A third direction of my research comprises the investigation of the influence of diet and nutrients on health and disease. Dietary choices significantly affect metabolic processes and oxidative stress, impacting overall well-being. Focusing on functional foods like *Boletus edulis* extract, curcumin, resveratrol, and vitamin E, I explored bioactive compounds' potential in modulating physiological pathways. These compounds emerged as promising candidates for preventing and treating chronic diseases, including obesity, diabetes, cardiovascular conditions, neurodegenerative disorders, and cancer. Moreover, these functional foods interact with the gut microbiota, underscoring their significance in holistic health strategies.

The second chapter of the present thesis focuses on my academic activity and professional achievements, highlighting my substantial contributions to academic and professional spheres and underscoring my dedicated involvement in pharmacology and academia.

The final chapter provides insights into my future strategies and perspectives for personal and career development, emphasizing my commitment to continuous growth and excellence in the field of pharmacology.

In summary, my research has yielded significant contributions to analgesia, drug repurposing, natural compound exploration, and the fight against antibiotic resistance. These findings have practical applications in chronic pain management, infectious disease treatment, and improving overall health outcomes.