

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „CAROL DAVILA”
BUCUREȘTI**

ȘCOALA DOCTORALĂ DOMENIUL FARMACIE

TEZĂ DE ABILITARE

REZUMAT

CANDIDAT,

Conferențiar Universitar Dr. Teodor Octavian Nicolescu

Universitatea de Medicină și Farmacie “CAROL DAVILA” București

2024

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „CAROL DAVILA”
BUCUREȘTI**

ȘCOALA DOCTORALĂ DOMENIUL FARMACIE

**SINTEZA, CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ, SPECTRALĂ ȘI
FARMACO-TOXICOLOGICĂ A UNOR NOI COMPUȘI CU
POTENȚIALĂ ACȚIUNE BIOLOGICĂ**

(analogi structurali ai tremorinei, derivați ai acetanilidei și 2,6-
pirimidindionei, noi compuși și sisteme de transport hibride pentru
agenți antiinflamatori)

CANDIDAT,

Conferențiar Universitar Dr. Teodor Octavian Nicolescu

Universitatea de Medicină și Farmacie “CAROL DAVILA” București

2024

REZUMAT

Teza de abilitare intitulată „*Sinteza, caracterizarea fizico-chimică, spectrală și farmaco-toxicologică a unor noi compuși cu potențială acțiune biologică (analogi structurali ai tremorinei, derivați ai acetanilidei și 2,6-pirimidindionei, noi compuși și sisteme de transport hibride pentru agenți antiinflamatori)*” prezintă rezultatele activității științifice pe care am desfășurat-o atât în cadrul Tezei de Doctorat cât și ulterior, dezvoltând tema inițială referitoare la sinteza și caracterizarea unor noi entități chimice destinate analgeziei și terapiei anticonvulsivante.

Pe parcursul activității la Disciplina de Chimie Organică am urmat patru direcții de cercetare principale:

1. noi analogi structurali ai tremorinei cu acțiune analgezică-anticonvulsivantă,
2. anestezice locale cu structură de tip amido, amido-eter, amido-ester și derivați ai 2,6-pirimidindionei,
3. noi entități chimice, sisteme hibride de transport și eliberare a substanței active în colon.
4. identificarea și caracterizarea unor principii active în produse vegetale și contaminanți

Majoritatea temelor de cercetare abordate au făcut obiectul unor proiecte de cercetare și granturi finanțate de către AMCSIT, CNCSIS sau MCT prin planurile naționale PN II și PN III.

Capitolul 1 cuprinde activitatea de cercetare desfășurată la Disciplina de Chimie Organică a Facultății de Farmacie, în cadrul Centrului de Cercetare “Sinteză și Analiză Organică” – Centru de tip C acreditat de către CNCSIS în anul 2001, dar și prin colaborări cu alte centre de cercetare și facultăți.

Capitolul 1.1 *Noi analogi structurali ai tremorinei cu acțiune analgezică și anticonvulsivantă* constituie Teza de Doctorat elaborată sub coordonarea domnului Profesor Universitar Dr. Mircea Iovu. În cadrul acestei lucrări am realizat sinteza, caracterizarea spectrală și farmaco-toxicologică a unor noi compuși urmărind înlocuirea legăturii triple din tremorina (1,4-dipirolidino-2-butina) cu inele aromatice diferit substituie cu grupe respingătoare de electroni, iar inelele pirolidinice au fost înlocuite cu inele azolice (imidazoli sau pirazoli) diferit substituie.

A fost cercetată acțiunea anticonvulsivantă față de convulsiile induse de pentetrazol și stricnină. S-a constatat că unii dintre noii compuși sintetizați determină creșterea latenței efectului

convulsivant cu valori de până la 83,75 %, în prima situație, respectiv cu până la 102,56 %, în cea de-a doua situație. Determinările s-au efectuat comparativ cu fenobarbitalul. Acest fapt a avut drept consecință scăderea mortalității la animalele de experiență cu valori apreciabile, de până la 80 % în cazul convulsiilor induse de pentetrazol. Cei mai activi au fost compușii din seria 3,5-dimetilpirazolului.

Acțiunea analgezică a fost cercetată comparativ cu noraminofenazona, ca stimuli algogeni utilizând acidul acetic 0,7 % și stimulul caloric. În primul caz, cei mai activi compuși au fost α,α' -bis[N-imidazol-1-il]2,4,6-trimetil-*m*-xilenul și α,α' -bis[N-(3,5-dimetil)pirazol-1-il]2,3,5,6-tetrametil-*p*-xilenul, care au reprezentat peste 75 % din acțiunea noraminofenazonei. În cel de-al doilea caz valorile nu au fost semnificative statistic.

Cercetarea **acțiunii antiinflamatoare** a evidențiat un efect mediu egal cu 50 % din cel produs de substanța de referință, fenilbutazona. Cel mai activ a fost α,α' -bis[N-(3,5-dimetil)pirazol-1-il]2,3,5,6-tetrametil-*p*-xilenul cu 61,17 % din activitatea fenilbutazonei.

Capitolul 1.2 Noi derivați ai acetanilidei și ai 2,6-pirimidindionei constituie o dezvoltare ulterioară a temei abordată în cadrul Tezei de Doctorat și se referă la sinteza și caracterizarea spectrală a unor noi compuși cu potențială acțiune anestezică locală și analgezică. Pornind de la postulatul lui Lofgren conform căruia o moleculă de anestezic local ar trebui să conțină cel puțin o grupă hidrofobă (ex. inel aromatic), un lanț anesteziofor (amido sau ester) și o grupă hidrofilă, am proiectat, folosind screening-ul de docking, noi entități moleculare utilizând acetanilida precum și inele pirimidinice diferit substituie inclusiv cu unul dintre atomii de azot blocați prin substituție cu un radical hidrocarbonat alchil sau aril.

Cercetările au fost efectuate mai ales în cadrul unor programe Naționale de Cercetare ca de exemplu **Programul RELANSIN, Subprogram CALITATEA VIETII**, finanțat de către ANSTI, ca **membru în colectivul de cercetare:**

1. *2-Barbitoxiacetanilide dintr-o clasă nouă de compuși fiziologic activi* (contract nr. 269/23.12.1999; perioada de desfășurare 2000-2002, Director de proiect Prof.Dr. Mircea Iovu).
2. *Noi α -lactamoacetildifenilamine cu acțiune anestezică* (parteneriat cu INCDCF București, contract nr. 271/23.12.1999; perioada de desfășurare 2000-2002, Director de proiect Prof.Dr. Mircea Iovu).

De asemenea, am câștigat prin concurs **Grantul CNCSIS “ α,α' -Bisbarbitoxi-xilileni dintr-o clasă nouă de compuși analgezici”** ca **director de proiect** (perioada de desfășurare 2001-2002, proiect de tip AT, contract nr. 7055/2001, tema B3).

Prin finanțarea acestor proiecte s-a asigurat desfășurarea temelor de cercetare dar și achiziții importante pentru dotarea Laboratorului de Chimie Organică (sticlărie de laborator, balanțe, spectrometru IR și cromatograf HPLC cu detector UV-Vis).

Capitolul 1.3 se referă la o abordare nouă în privința terapiei bolii Crohn. Se cunoaște faptul că mesalazina – antiinflamator de elecție în afecțiunile inflamatorii ale colonului se administrează în doze mari. Urmărind creșterea indicelui terapeutic, scăderea dozelor administrate dar și scăderea în intensitate a efectelor adverse, am efectuat studii complexe privind modificarea structurii moleculei de referință (acidul 5-aminosalicilic) și încorporarea noului compus într-un sistem bioconjugat de transport la țintă și eliberare controlată.

De asemenea, a fost realizat un studiu amplu privind încorporarea mesalazinei într-un sistem inovator reprezentat de HNT-Haloisit, o argilă cu structură tubulară. Totodată sau efectuat încorporări ale mesalazinei în beta-ciclodextrină având structură modificată cu HMDI (hexametilen-diizocianat). Au fost realizate determinări enzimatică apelând la metoda fluorimetrică pentru evaluarea activității asupra mieloperoxidazei (MPO), TNF-alfa umană (o citokină-factor proinflamator) și respectiv asupra interleukin-6 (factor proinflamator).

Cercetările au fost finanțate prin două proiecte în **Planul Național (PN III)**:

1. Proiectarea unor bioconjugate cu eliberare țintită pentru tratarea bolilor inflamatorii intestinale, Nr. proiect: 39/PCCDI, acronim INTELMAT, ca **responsabil de proiect din partea U.M.F. “Carol Davila”**, perioada de desfășurare 2018-2021.

2. Noi tehnologii de sinteză a materialelor hibride sensibile la variații de pH pe bază de halosit și ciclodextrină pentru tratarea bolilor inflamatorii intestinale, Contract nr. 604PED/2022/ Acronim MEDEXIBD/ Cod Proiect PN-III-P2-2.1-PED-2021-2488, ca **responsabil proiect din partea U.M.F. “Carol Davila”**, perioada de desfășurare 2022-2024.

Am considerat că tratamentul folosind un promedicament conținând un rest de acid 5-aminosalicilic (5-ASA) este esențial pentru un efect terapeutic eficient. În acest sens, utilizarea bioconjugatului 5-ASA-PEG/PC a urmărit eliberarea de 5-ASA ca ingredient activ 5-ASA-PEG la nivel intestinal.

Noul compus a fost caracterizat prin spectrometrie (FT-IR, ^1H -RMN și ^{13}C -RMN) și s-au efectuat determinări de activitate asupra mieloperoxidazei (MPO).

Concentrația optimă de 5-ASA a fost determinată folosind un model de linie celulară standardizată, iar testele de biocompatibilitate au arătat că sistemul este biocompatibil la concentrații scăzute (până la 1,5 mg/ml), dar exercită efecte citotoxice la concentrații mai mari (3-6 mg/ml) atât în condiții normale cât și patologice. Testele alternative de toxicitate folosind crustaceele *Artemia salina* și *Daphnia magna* au confirmat, de asemenea, că bioconjugatul 5-ASA PEG-ilat a indus o toxicitate mai mică în comparație cu 5-ASA singur, sugerând o potențială transformare a promedicamentului în componenta sa activă de către enzime. Aceste descoperiri oferă perspective importante pentru dezvoltarea sistemelor eficiente de administrare a medicamentelor pentru bolile inflamatorii intestinale.

Capitolul 1.4 se referă la analiza spectrală a helebrigenin-3-acetatului ce a constituit o provocare deoarece în literatura de specialitate se considera că acest compus nu se regăsește în produsul vegetal *Helleborus Niger L. SSP. Niger*. Prin spectrometrie de masă folosind tehnica de ionizare ESI am dovedit prezența grupei acetil în poziția 3 pe inelul A al scheletului ciclopentan-perhidrofenantrenic propunând și o schemă de fragmentare.

Capitolul 2 se referă la parcursul profesional, activitatea de cercetare științifică și didactică desfășurată la Disciplina de Chimie Organică a Facultății de Farmacie.

Capitolul 3 cuprinde descrierea planului de evoluție academică și direcțiile de cercetare ulterioare.

ABSTRACT

Habilitation thesis entitled "*Synthesis, physico-chemical, spectral and pharmacotoxicological characterization of new compounds with potential biological action (structural analogues of tremorin, derivatives of acetanilide and 2,6-pyrimidinedione, new compounds and hybrid transport systems for suppliers anti-inflammatory)*" presents scientific activities that I carried out both in the framework of the Doctoral Thesis and later, developing the initial theme related to the synthesis and characterization of new chemical entities intended for analgesia and anticonvulsant therapy.

During the activity at the Organic Chemistry Discipline, I followed four main research directions:

1. new structural analogues of tremorin with analgesic-anticonvulsant action,
2. local anesthetics with amido, amido-ether, amido-ester and 2,6-pyrimidinedione derivatives,
3. new chemical entities, hybrid systems of transport and release of the active substance in the colon.
4. identification and characterization of some active principles in plant products and contaminants

Most of the research topics addressed were the subject of research projects and grants financed by AMCSIT, CNCSIS or MCT through the national plans PN II and PN III.

Chapter 1 includes the research activity carried out at the Organic Chemistry Discipline of the Faculty of Pharmacy, within the "Organic Synthesis and Analysis" Research Center - Type C Center accredited by CNCSIS in 2001, but also through collaborations with other research centers and faculties.

Chapter 1.1 "New structural analogs of tremorin with analgesic and anticonvulsant action" constitute the Doctoral Thesis developed under the coordination of Professor Mircea Iovu, PhD. In this work, we performed the synthesis, spectral and pharmacotoxicological characterization of some new compounds aiming to replace the triple bond in tremorin (1,4-dipyrrolidino-2-butyne) with aromatic rings differently substituted with electron-repelling groups, and the pyrrolidine rings have been replaced by differently substituted azole rings (imidazoles or pyrazoles).

The anticonvulsant action against convulsions induced by pentetrazole and strychnine was investigated. It was found that some of the new synthesized compounds increase the latency of the convulsive effect with values of up to 83.75%, in the first situation, respectively up to 102.56%,

in the second situation. The determinations were made in comparison with phenobarbital. This fact had the consequence of decreasing mortality in experimental animals with appreciable values, up to 80% in the case of convulsions induced by pentetrazol. The most active were the compounds from the 3,5-dimethylpyrazole series.

The analgesic action was investigated compared to noraminophenazone, as algogenic stimuli using 0.7% acetic acid and the caloric stimulus. In the first case, the most active compounds were α,α' -bis[N-imidazol-1-yl]2,4,6-trimethyl-*m*-xylene and α,α' -bis[N-(3,5 -dimethyl)pyrazol-1-yl]2,3,5,6-tetramethyl-*p*-xylene, which represented over 75% of the action of noraminophenazone. In the second case the values were not statistically significant.

The anti-inflammatory action research highlighted an average effect equal to 50% of that produced by the reference substance, phenylbutazone. The most active was α,α' -bis[N-(3,5-dimethyl)pyrazol-1-yl]2,3,5,6-tetramethyl-*p*-xylene with 61.17% of the activity of phenylbutazone.

Chapter 1.2 “New derivatives of acetanilide and 2,6-pyrimidinedione” is a further development of the theme addressed in the Doctoral Thesis and refers to the synthesis and spectral characterization of some new compounds with potential local anesthetic and analgesic action. Starting from Lofgren's postulate that a local anesthetic molecule should contain at least one hydrophobic group (e.g. aromatic ring), one anesthesiophoric chain (amido or ester) and one hydrophilic group, we designed using docking screening new molecular entities using acetanilide as well as differently substituted pyrimidine rings including one of the nitrogen atoms blocked by substitution with an alkyl or aryl hydrocarbon radical.

The researches were carried out mainly within the framework of some National Research programs such as the RELANSIN Program, QUALITY OF LIFE Subprogramme, financed by ANSTI, as a member of the research group:

1. 2-Barbitoxyacetanilides from a new class of physiologically active compounds (contract no. 269/23.12.1999; implementation period 2000-2002, Project Director Professor Mircea Iovu, PhD).
2. New α -lactamoacetyldiphenylamines with anesthetic action (partnership with INCDCF Bucharest, contract no. 271/23.12.1999; implementation period 2000-2002, Project Director Professor Mircea Iovu, PhD).

I also won the CNCSIS Grant " α,α' -Bisbarbitoxy-xylylenes from a new class of analgesic compounds" as a project director (period 2001-2002, AT type project, contract no. 7055/2001), topic B3).

Through the financing of these projects, the development of research topics was ensured, as well as important purchases for the equipment of the Organic Chemistry Laboratory (laboratory glassware, balances, IR spectrometer and HPLC chromatograph with UV-Vis detector).

Chapter 1.3 deals with a new approach to Crohn's disease therapy. It is known that mesalazine - the anti-inflammatory of choice in inflammatory conditions of the colon is administered in large doses. Following the increase in the therapeutic index, the decrease in the administered doses and the decrease in the intensity of the adverse effects, we performed complex studies regarding the modification of the structure of the reference molecule (5-aminosalicylic acid) and the incorporation of the new compound into a bioconjugate system for target transport and controlled release.

Also, an extensive study was carried out regarding the incorporation of mesalazine in an innovative system represented by HNT-Halosit, a clay with a tubular structure. At the same time, he incorporated mesalazine into beta-cyclodextrin having a modified structure with HMDI (hexamethylene diisocyanate). Enzymatic determinations were carried out using the fluorimetric method to evaluate the activity on myeloperoxidase (MPO), human TNF-alpha (a cytokine-proinflammatory factor) and interleukin-6 (proinflammatory factor).

The research was financed through two projects in the National Plan (PN III):

1. The design of bioconjugates with targeted release for the treatment of inflammatory bowel diseases, No. project: 39/PCCDI, acronym INTEL MAT, as project manager from U.M.F. "Carol Davila", 2018-2021 performance period.
2. New technologies for the synthesis of hybrid materials sensitive to pH variations based on halosite and cyclodextrin for the treatment of inflammatory bowel diseases, Contract no. 604PED/2022/ Acronym MEDEXIBD/ Project Code PN-III-P2-2.1-PED-2021-2488, as project manager from U.M.F. "Carol Davila", the 2022-2024 performance period.

We considered that treatment using a prodrug containing a 5-aminosalicylic acid (5-ASA) moiety is essential for an effective therapeutic effect. In this sense, the use of the 5-ASA-PEG/PC bioconjugate targeted the release of 5-ASA as the active ingredient 5-ASA-PEG at the intestinal level.

The new compound was characterized by spectrometry (FT-IR, ¹H-NMR and ¹³C-NMR) and myeloperoxidase (MPO) activity determinations were performed.

The optimal concentration of 5-ASA was determined using a standardized cell line model, and biocompatibility tests showed that the system is biocompatible at low concentrations (up to 1.5 mg/ml) but exerts cytotoxic effects at higher concentrations (3-6 mg/ml) in both normal and pathological conditions. Alternative toxicity tests using the crustaceans *Artemia salina* and *Daphnia magna* also confirmed that the PEG-ylated 5-ASA bioconjugate induced less toxicity compared to 5-ASA alone, suggesting a potential transformation of the prodrug into its active component by to enzymes. These findings provide important insights for the development of effective drug delivery systems for inflammatory bowel diseases.

Chapter 1.4 refers to the spectral analysis of hellebrigenin-3-acetate, which was a challenge because in the specialized literature it was considered that this compound is not found in the plant product *Helleborus Niger L. SSP. Niger*. By mass spectrometry using the ESI ionization technique, we proved the presence of the acetyl group in position 3 on ring A of the cyclopentane-perhydrophenantrene skeleton, also proposing a fragmentation scheme.

Chapter 2 refers to the professional course, the scientific and didactic research activity carried out at the Organic Chemistry Discipline of the Faculty of Pharmacy.

Chapter 3 includes the description of the academic development plan and further research directions.