
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Designul, sinteza și evaluarea activității biologice a unor noi compuși chinazolin-4-onici

Doctorand **Raluca Pele**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Ovidiu Oniga**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	3
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	3
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	4
1. Ipoteza de lucru	4
2. Studiul 1 – Sinteza și activitatea antioxidantă a unor noi derivați chinazolin-4-onici difenolici. Evaluare <i>in vitro</i> și <i>in silico</i>	4
Introducere	4
Ipoteza de lucru	4
Material și metodă	5
Rezultate și discuții	5
Concluzii	6
3. Studiul 2 – Noi chinazolin-4(3H)-one di/trifenolice. Design rațional, sinteză și evaluarea activității citotoxice și antioxidante <i>in vitro</i> și <i>in silico</i>	6
Introducere	6
Ipoteza de lucru	6
Material și metodă	6
Rezultate și discuții	7
Concluzii	8
4. Studiul 3 – Sinteza și activitatea anticonvulsivantă a unor noi compuși chinazolin-4-onici. Evaluare <i>in vivo</i> și <i>in silico</i>	8
Introducere	8
Ipoteza de lucru	8
Material și metodă	9
Rezultate și discuții	9
Concluzii	10
5. Concluzii generale	10
6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	10
REFERINȚE	11

Cuvinte cheie: chinazolin-4(3H)-onă, antioxidant, anticonvulsivant, andocare moleculară, dinamică moleculară

INTRODUCERE

În zilele noastre, cercetarea în chimia medicamentului urmează o altă viziune în practică, aplicând metode *in silico* prin care să fie conceput un design rațional al medicamentului. Evoluția rapidă a abordărilor computaționale a scurtat timpul și costurile financiare prin găsirea unor noi candidați terapeutici, cu o eficacitate crescută și cu reacții adverse reduse comparativ cu medicamentele deja existente pe piața farmaceutică.

Prin expunerea acestei perspective, ne-am propus dezvoltarea chimică și farmacologică a unor noi compuși capabili să exercite o bioactivitate complexă prin derivatizarea diferită a unui *scaffold* de bază. O clasă de astfel de compuși care a captat atenția cercetătorilor datorită proprietăților biologice, variate descrise pe baza rezultatelor raportate în literatura de specialitate este reprezentată de derivații de chinazolin-4(3H)-onă. Scopul cercetărilor din prezenta lucrare a fost de identificare a unor molecule leader caracterizate prin activitate biologică și profil farmacocinetic notabile, în cadrul fiecărei serii de compuși sintetizați.

În prima parte a tezei este prezentat stadiul actual al cunoașterii în domeniul chimiei și acțiunii biologice a compușilor chinazolin-4-onici. În a doua parte a acestei lucrări este prezentată cercetarea doctorală desfășurată și rezultatele obținute, organizate în trei capitole. În toate studiile s-au folosit algoritmi computaționali care au facilitat interpretarea rezultatelor.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Chinazolin-4(3H)-ona este un sistem heterociclic format dintr-un nucleu benzenic condensat cu 4-pirimidinona. Acest sistem biciclic este considerat o structură de bază reprezentativă denumită *scaffold* în literatura de specialitate specifică chimiei medicale, fiind prezent în compuși cu activitate biologică variată¹⁻⁴.

Progresele chimiei organice de sinteză din ultimele decenii au facilitat obținerea unei mari diversități de compuși chinazolin-4(3H)-onici, variat substituiți în pozițiile 2, 3, 5, 6, 7 și 8¹. În cadrul tezei de doctorat sunt prezentate metodele convenționale și cele moderne de obținere a 4(3H)-chinazolinonelor 2-substituite, 3-substituite și 2,3-disubstituite. Natura substituenților din pozițiile 2, 3, 5, 6, 7 și 8 influențează în mod diferit și variat activitatea chinazolin-4-onelor. Substituția în pozițiile 2 și 3 ale heterociclului chinazolin-4(3H)-onic are o influență semnificativă asupra activității biologice.

Gradul de actualitate a tematicii abordate în prezenta lucrare a fost determinat prin analiza bibliometrică efectuată pentru perioada anilor 1993-2023, accesând baza de date Web of Science (WoS, Clarivate Analytics). Tema aleasă este una de larg interes la momentul actual, cu cele mai multe publicații în anul precedent (2023), iar una dintre cele mai de interes activități biologice în cercetarea din acest domeniu este cea antitumorală.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Ipoteza de lucru

Nevoia stringentă de noi compuși cu proprietăți antiradicalice, capabili să neutralizeze speciile radicalice de oxigen și de azot implicate în patogeneza unor boli cu morbiditate și mortalitate foarte ridicate (cancer sau afecțiuni cardiovasculare), a condus cercetarea, într-o primă etapă, către un design rațional și un proiect de sinteză privind dezvoltarea chimică a mai multor molecule hibride de tip chinazolin-4-on-spațiator-polifenol (heterociclul chinazolin-4-onic fiind structura *scaffold* a moleculei). Spațiatorul (linkerul) pe care l-am ales, este fie un rest mercaptoacetohidrazonic, fie un rest mercaptoacetamidic, care să permită rotația liberă a substituentului din poziția 2 la nivelul legăturii sigma C2 (din chinazonă)-S, astfel încât moleculele să realizeze conformațiile spațiale optime pentru exercitarea efectului biologic.

Pe de altă parte, o altă problematică de interes în cercetarea specifică chimiei medicale este reprezentată de designul și dezvoltarea unor noi terapii anticonvulsivante ⁵. În lucrarea de față ne-am propus să realizăm un design rațional, să sintetizăm și să testăm în experiment *in vivo*, mai mulți derivați chinazolin-4-onici cu structuri chimice noi, în care fragmentele polifenolice au fost înlocuite cu resturi nehidroxilate, mai lipofile.

Obiectivele cercetării și principalele activități pe care le-am realizat în cadrul cercetării doctorale sunt: 1) sinteza unor noi derivați de chinazolin-4-onă pe baza unui design rațional chimic și farmacologic; 2) caracterizarea fizico-chimică și analiza spectrală a compușilor chinazolin-4-onici obținuți; 3) evaluarea activității antioxidante *in vitro* prin aplicarea de teste antiradicalice bazate pe transferul de electroni și teste de chelatare a unor metale tranzitionale; 4) evaluarea activității antioxidante *in silico* prin folosirea descriptorilor cuantici și termodinamici; 5) evaluarea proprietăților moleculare *in silico* care influențează farmacocinetica compușilor; 6) evaluarea citotoxicității *in vitro* a unora dintre compușii obținuți; 7) evaluarea activității anticonvulsivante *in vivo* prin aplicarea modelului convulsiv indus cu pentilentetrazol și a testului de antagonism al flumazenilului; 8) predicția activității anticonvulsivante *in silico* prin studii de andocare moleculară și simulări de dinamică moleculară; 9) predicția logP *in silico* a compușilor cu activitate anticonvulsivantă optimă.

2. Studiul 1. Sinteza și activitatea antioxidantă a unor noi derivați chinazolin-4-onici difenolici. Evaluare *in vitro* și *in silico*

Introducere

Dezvoltarea de noi agenți terapeutici cu activitate antioxidantă, reprezintă o direcție importantă a cercetării din domeniul chimiei medicale, deoarece antioxidanții (naturali, semisintetici sau de sinteză chimică totală) protejează celulele împotriva speciilor reactive de oxigen (ROS) și a speciilor reactive de azot (RNS), prin eliberarea de atomi de hidrogen care le neutralizează din organism ⁶.

Ipoteza de lucru

Reunirea printr-un linker tioacetohidrazonic a două fragmente structurale (chinazolin-4-ona cu rol de *scaffold* și farmacoforul difenolic) ar putea manifesta o activitate antioxidantă notabilă. Alegerea acestui linker a fost făcută din două considerente importante: flexibilitatea fragmentului tio-metilenic din structura linkerului, dată de atomul de sulf și de atomul de carbon hibridizat sp^3 , și rigiditatea fragmentului de hidrazid-hidrazonă (cealaltă componentă a structurii linker), ales pentru proprietățile sale de chelatare a unor ioni ai metalelor tranzitionale ^{7,8}. Compușii finali sunt variați substituți în poziția 3 cu resturi alchil (etil, respectiv butil), un rest aril alchilic (benzil), respectiv un rest alifatic nesaturat (alil).

Material și metodă

Sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală

În acest studiu sunt prezentate obținerea chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală a 12 compuși, **5a-l**, obținuți printr-o succesiune de reacții (4 etape, pornind-se de la acidul antranilic și 4 izotiocianați).

Testări in vitro ale activității antioxidante, antiradicalice și de chelatare

Cu ajutorul spectrofotometrului UV-Vis Jasco V-530 (Jasco International Co., Tokyo, Japonia), a fost evaluată activitatea antioxidantă sau antiradicalică, printr-o serie de teste: antiradicalice (teste de captare a radicalilor ABTS^{•+}, DPPH[•], NO[•]), bazate pe transfer de electroni (testele FRAP, TAC, RP, CUPRAC) sau de chelatare a ionilor metalelor tranzitionale (Fe²⁺, Cu²⁺).

Calculare teoretice cuantice și termodinamice

Conform literaturii de specialitate, relațiile structură-activitate antioxidantă pot fi descrise cu ajutorul unor descriptori cuantici și termodinamici, respectiv prin nivelurile de energie orbitală de frontieră HOMO (The Highest Occupied Molecular Orbital) și LUMO (The Lowest Unoccupied Molecular Orbital). Toate studiile teoretice prezentate au fost efectuate folosind protocoalele raportate anterior în literatură ⁹. Prin folosirea Chimera 1.10.2, au fost generate imaginile care reprezintă conformațiile cu cea mai scăzută energie ale compușilor.

Rezultate și discuții

Sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală

Materia primă de la care a început sinteza chimică a fost acidul antranilic, supus unei reacții de condensare cu patru izotiocianați, prin refluxare în etanol, obținându-se 2-mercapto-4(3H)-chinazolinonele **1a-d**, variați substituți în poziția 3 ¹⁰. Compușii **2a-d** au fost obținuți prin reacția de S-alchilare a compușilor **1a-d** cu bromoacetatul de etil. Prin reacția de hidrazinolisă a esterilor **2a-d** cu hidrat de hidrazină, în etanol la temperatura camerei, au rezultat (4-chinazolin-2-il)-tioacetohidrazidele **3a-d**. Compușii finali **5a-l** au fost obținuți prin refluxarea în etanol a hidrazidelor **3a-d**, cu benzalhidele hidroxilate **4a-c**. Analiza spectrelor IR, MS, ¹H-RMN și ¹³C-RMN au relevat toate semnalele urmărite pentru compușii sintetizați: **1a-d**, **2a-d**, **3a-d** și **5a-l**.

Testări in vitro ale activității antioxidante, antiradicalice și de chelatare

În testările antiradicalice (ABTS^{•+}, DPPH[•] și NO[•]), compușii **5h**, **5j** și **5k** au prezentat o activitate de captare a radicalilor mai mare decât cea a antioxidanților de referință utilizați (acid ascorbic, trolox, acidul gentizic). Prin aplicarea testelor FRAP, TAC și CUPRAC, derivații difenolici **5a**, **5b**, **5d**, **5e**, **5g**, **5h**, **5j** și **5k** au fost compușii cei mai activi. Cele cele mai bune proprietăți de chelatare a ionilor metalelor tranzitionale (Fe²⁺ și Cu²⁺), le-au demonstrat derivații de catecol 2,3-disubstituiți **5d** și **5j**, chiar dacă activitatea lor a fost inferioară EDTA-ului sodic.

Calcul teoretice cuantice și termodinamice

Analizând decalajul HOMO–LUMO, cele mai scăzute valori au fost identificate în cazul derivaților de catecol – mai precis, în cazul seriei de compuși 2,3-disubstituiți (**5a**, **5d**, **5g** și **5j**). Dintre derivații analizați, compușii care au o grupare hidroxil grefată în poziția 2 pe restul fenil au cea mai puternică activitate antioxidantă.

Concluzii

Prin evaluarea activității antioxidante *in vitro* a noilor derivați difenolici de 4(3H)-chinazolinonă, compușii **5h**, **5j** și **5k** s-au dovedit a avea o activitate de captare a speciilor radicalice de oxigen superioară antioxidanților de referință utilizați. Deși rezultatele obținute sunt mai mult decât încurajatoare, studiul are și unele limitări, deoarece nu s-au utilizat și modele experimentale pe celule și pe animale, aspecte pe care ne propunem să le abordăm în viitor.

3. Studiul 2. Noi chinazolin-4(3H)-one di/trifenolice. Design rațional, sinteză și evaluarea activității citotoxice și antioxidante *in vitro* și *in silico*

Introducere

Un subiect de actualitate, intens studiat, este stresul oxidativ și efectele sale asupra organismului uman, menționat în studiul anterior. Se cunoaște faptul că boala canceroasă se dezvoltă în trei etape distinte: inițierea, promovarea și progresia. Stresul oxidativ este un factor care promovează oricare dintre aceste etape ¹¹.

Ipoteza de lucru

Încurajați de rezultatele promițătoare raportate în studiul anterior, în continuarea cercetării ne-am propus designul rațional, dezvoltarea chimică și evaluarea activității citotoxice asociată cu proprietățile antiradicalice ale unor noi molecule chinazolin-linker-trifenolice (seria **7a-d**), respectiv chinazolin-linker-difenolice (seria **8a-d**), molecule diferite de cele raportate în studiul 1 ¹². În seria de compuși **8a-d**, spațiatorul tioacetohidrazonic conține un rest metil suplimentar care, considerăm că poate contribui la optimizarea balanței lipofil-hidrofile a compușilor ^{13,14}. Totodată, s-a urmărit selectarea compusului chinazolin-4(3H)-onic care manifestă cea mai scăzută toxicitate asupra celulelor sănătoase și o citotoxicitate crescută împotriva a două linii celulare canceroase (A549 și LNCaP).

Material și metodă

Sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală

În prezentul studiu sunt descrise sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală a 8 compuși, **7a-d** și **8a-d**, pornind de la acidul antranilic și 4 izotiocianați.

Testări in vitro ale activității antioxidante, antiradicalice și de chelatare

Activitatea antioxidantă, antiradicalică sau de chelatare s-a determinat conform protocoalelor aplicate în studiul anterior.

Calcul teoretice cuantice și termodinamice

Relațiile structură-activitate antioxidantă, determinate ca urmare a prezenței unor grupe fenolice, pot fi descrise aplicând protocoalele prezentate în studiul 1.

Testarea activității citotoxice in vitro

Acest experiment a fost realizat pe trei linii celulare: una de celule normale (BJ - fibroblaști de prepuț uman) și două de celule canceroase (A549 - adenocarcinom pulmonar și LNCaP - carcinom de prostată), achiziționate de la American Type Culture Collection (Manassas, VA, SUA). Viabilitatea celulară s-a evaluat prin aplicarea testului Alamar Blue (AB)¹⁵. Examinarea statistică a datelor a fost efectuată prin analiza unidirecțională a varianței (ANOVA), cu un test post-hoc Holm-Sidak. Reprezentarea grafică și analiza datelor s-a realizat cu ajutorul software-ului SigmaPlot 11.0 (Systat, Software Inc., Chicago, IL, SUA). Rezultatele au fost considerate ca fiind validate din punct de vedere statistic la valori ale $p < 0.05$.

Proprietățile moleculare care influențează farmacocinetica compușilor

Pentru a obține informații preliminare cu privire la proprietățile moleculare care ar putea influența farmacocinetica compușilor, a fost utilizată platforma SwissADME¹⁶. Proprietățile moleculare evaluate au fost aria suprafeței polare topologice (TPSA)¹⁷, coeficientul de partiție octanol-apă exprimat ca LogP¹⁸, solubilitatea în apă¹⁹ și cele 5 reguli ale lui Lipinski¹⁸.

Rezultate și discuții

Sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală

Prin reacția de condensare a hidrazidelor **3a-d** cu 2,3,4-trihidroxibenzaldehida (**6a**) sau cu 2,4-dihidroxi-acetofenona (**6b**) s-au obținut 8 compuși finali, **7a-d** și **8a-d**. Prin analiza spectrelor IR, MS, ¹H-RMN și ¹³C-RMN au fost identificate toate semnalele vibrațiilor urmărite pentru compușii sintetizați **7a-d** și **8a-d**.

Testări in vitro ale activității antioxidante, antiradicalice și de chelatare

Potențialul antiradicalic și de chelatare al derivaților de pirogalol **7a-d** a fost superior compușilor **8a-d**.

Calcul teoretice cuantice și termodinamice

Decalajul HOMO-LUMO a fost mai mare la compușii **7a**, **7b**, **7c** și **7d**, derivați de pirogalol, în timp ce compușii **8a**, **8b**, **8c** și **8d**, derivați de 2,4-dihidroxi-acetofenonă au indicat valori mai mici. Grupa funcțională cea mai susceptibilă de a ceda atomi de hidrogen considerăm că este OH-ul fenolic din poziția *meta* (situsul O-H₂), față de linker, care se găsește în structura compușilor **7a**, **7b**, **7c** și **7d**.

Testarea activității citotoxice in vitro

Compușii **8a-d** au indus o citotoxicitate mai mare decât ceilalți compuși pe liniile celulare A549 și LNCaP, la concentrații mai mici, în timp ce compușii **7a-d** au exercitat o citotoxicitate mai mare la doze medii și mari. Viabilitatea celulară relativă a înregistrat un procent semnificativ la celulele normale, comparativ cu cele canceroase, după expunerea la compușii sintetizați. Activitatea antioxidantă este puternic influențată de cea de-a treia grupă fenolică din structură. Grupa metil nu crește potențialul antioxidant al compușilor, dar influențează citotoxicitatea acestora asupra liniilor celulare luate în studiu ²⁰.

Proprietățile moleculare care influențează farmacocinetica compușilor

Modul în care sunt influențate proprietățile farmacocinetice ale compușilor în funcție de natura substituenților urmează tendința așteptată în chimia medicinală și în proiectarea de noi compuși bioactivi.

Concluzii

Derivații care conțin în structură un rest de pirogalol (compușii **7a-d**) au o activitatea antioxidantă mai bună decât a antioxidanților de referință. Într-o ipoteză terapeutică, acești compuși sunt citocompatibili cu țesutul sănătos.

4. Studiul 3. Sinteza și activitatea anticonvulsivantă a unor noi compuși chinazolin-4-onici. Evaluare *in vivo* și *in silico*

Introducere

Receptorii GABA_A prezintă în structura lor și situsuri alosterice specifice, prin care semnalizarea GABA poate fi influențată indirect cu modulatori alosterici, cum sunt barbituricele, benzodiazepinele, neurosteroidii și anestezele ²¹.

Ipoteza de lucru

În studiile efectuate asupra metaqualonei, un compus chinazolin-4-onic cu proprietăți sedativ-hipnotice, au fost remarcate bune proprietăți anticonvulsivante, datorită calității sale de modulator alosteric pozitiv (PAM – Positive Allosteric Modulator) al receptorului GABA_A. Studiile privind relațiile structură-activitate (SAR) au arătat că, pentru exercitarea activității antiepileptice, metaqualona și analogii săi cu structură chinazolin-4(3H)-onică trebuie să îndeplinească anumite cerințe structurale: prezența heterociclului chinazolin-4(3H)-onic ca domeniu hidrofob, atomul de azot N¹ cu rol de donor de electroni și prezența grupei carbonil ca situs la nivelul căruia se pot forma legături de hidrogen. Substituenții din pozițiile 2 și 3 sunt responsabili în special de proprietățile farmacocinetice și de potențialul anticonvulsivant ²².

Pornind de la aceste observații, scopul acestui studiu a fost sinteza unor noi serii de derivați de chinazolin-4-onă cu potențial anticonvulsivant, prin modularea chimică a pozițiilor 2 și 3, optimizând interacțiunea atât cu situsurile alosterice ale receptorului GABA_A, cât și cu situsul activ al anhidrazei carbonice (CA). În poziția 3 au fost introduși substituenți cu o rigiditate mai mică, un rest alil (seria „a”) și un rest benzil (seria „b”), prin intermediul cărora să aibă loc o pătrundere mai profundă într-unul dintre buzunarele hidrofobe ale țintelor. Substituenții din poziția 2 sunt reprezentați de

diferite fragmente S-metil-ceto-arilic sau S-acetamidă, capabile să coordoneze ionul de zinc (Zn^{2+}) din centrul activ al CA pentru a obține un efect inhibitor asupra acesteia ²³.

Material și metodă

Sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală

În acest studiu au fost sintetizați, caracterizați fizico-chimic și spectral 18 derivați de chinazolin-4-onă, grupați în două serii, „a” și „b”. Materiile prime care au stat la baza sintezei chimice au fost acidul antranilic și 2 izotiocianați.

Testarea activității anticonvulsivante in vivo

Animalele de laborator au fost șoareci albi, femele, de 6-10 săptămâni, din specia *Mus musculus* (CD1), cu o greutate cuprinsă între 25-35 g, procurate de la Centrul de Medicină Experimentală și Abilități Practice (Biobaza) al Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca. Experimentele *in vivo* (modelul convulsiv indus cu pentilentetrazol (PTZ), unde substanțele de referință au fost diazepamul și fenobarbitalul, și testul de antagonism al flumazenilului) au fost realizate după obținerea unui aviz favorabil al Comisiei de Etică a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca și al Direcției Sanitar Veterinare și Pentru Siguranța Alimentelor Cluj ²⁴⁻²⁶.

Studii in silico

Aplicând modelul implementat de Antonie și colab. ²⁷ s-a determinat lipofilia compușilor testați prin predicția *LogP*, utilizând platforma SwissADME ¹⁶. Studiul de andocare moleculară s-a realizat cu AutoDock Tools, cu un câmp de forță special conceput pe baza unor interacțiuni care implică ionul de zinc ²⁸. S-a realizat și un studiu secundar de andocare moleculară folosind AutoDock vina 1.2.1., cu un spațiu de andocare proiectat ca volum al unui cub cu laturile $x = y = z = 2$, pentru confirmarea rezultatelor obținute ²⁹. Structurile 3D ale macromoleculor țintă au fost preluate din Protein Data Bank ³⁰. Prin utilizarea software-ului Chimera 1.10.2 ³¹, au fost generate interacțiunile moleculare dintre liganzi și macromoleculor țintă, iar complexii rezultați au fost evidențiați prin diagrame de interacțiune 2D cu ajutorul software-ului LigPlot+ 2.2 ^{32,33}. Au fost efectuate simulări de dinamică moleculară ale complexilor compuși-anhidrază carbonică II cu ajutorul software-ului GROMACS 2023 ³⁴, folosind câmpul de forță CHARMM36 ³⁵, prin respectarea unor protocoale care anterior raportate în literatura de specialitate ³⁶. Vizualizarea evoluției complexilor compuși-anhidrază carbonică II a fost realizată cu ajutorul VMD 1.9.4 ³⁷.

Rezultate și discuții

Sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică și spectrală

Compușii **1a-9a** și **1b-9b** au fost obținuți prin condensarea 3-alil-2-mercaptchinazolin-4(3H)-onei sau a 3-benzil-2-mercaptchinazolin-4(3H)-onei cu derivați de α -bromoacetofenonă, p-(α -bromoacetil)-naftalină și iodoacetamidă. Spectrele IR, MS, ¹H-RMN și ¹³C-RMN ale compușilor **1a-9a** și **1b-9b** au fost caracterizate prin prezența tuturor semnalelor vibrațiilor de interes.

Testarea activității anticonvulsivante in vivo

Aplicând *modelul convulsiv indus cu pentilentetrazol (PTZ)* la șoareci, compușii **7a** și **8b** au conferit o protecție în procent de 100%, rezultate similare cu cele ale agenților de referință. Prin *testul de antagonism al flumazenilului* cei mai activi compuși (**7a**, **8b**) nu au mai demonstrat o bună capacitate de protecție împotriva convulsiilor induse cu PTZ la șoareci, sugerând un posibil mecanism de acțiune ca modulatori alosterici pozitivi ai receptorului GABA_A.

Studii *in silico*

Conform *predicției LogP*, compușii substituiți în poziția 3 a heterociclului chinazolin-4-onic cu restul benzil (seria „b”) sunt mai lipofili decât compușii din seria „a”, substituiți în poziția 3 cu restul alil, sugerând o capacitate mai bună de a trece prin bariera hemato-encefalică pentru a-și atinge ținta. Studiile *in silico de andocare și de dinamică moleculară* au arătat o afinitate de legare mai mare față de receptorul GABA_A a compușilor din seria „b” comparativ cu compușii din seria „a”, în timp ce complexii ligand-anhidraza carbonică II proiectați au fost instabili în timp, în cazul ambelor serii de compuși.

Concluzii

În cazul compușilor testați propunem un mecanism de acțiune la nivelul receptorului GABA_A, ca modulatori alosterici pozitivi în studiile *in silico*, considerăm însă că sunt necesare teste de afinitate suplimentare pentru a confirma această ipoteză.

5. Concluzii generale

În cercetarea de față s-a realizat sinteza chimică a 3 serii de chinazolin-4-one (în total 38 de compuși finali), 33 dintre aceștia nefiind raportați anterior în literatura de specialitate. A fost evaluată activitatea antioxidantă (derivații chinazolin-4-onici difenolici **5a-l**), antioxidantă și citotoxică (derivații chinazolin-4(3H)-onici di/trifenolici **7a-d** și **8a-d**), respectiv pentru activitatea anticonvulsivantă (derivații chinazolin-4-onici non-fenolici **1a-9a**, respectiv **1b-9b**), prin teste *in vitro*, *in vivo* și *in silico*. Scopul principal al cercetării l-a reprezentat descoperirea de noi molecule HIT sau LEAD, în cadrul seriilor de compuși sintetizați și testați, care să respecte cât mai multe dintre regulile lui Lipinski.

6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Considerăm că principalele elemente de originalitate ale tezei de doctorat sunt:

- 1) Proiectarea rațională, în unele cazuri asistată de calculator, a unor noi compuși chinazolin-4-onici, divers substituiți în pozițiile 2 și 3.
- 2) Sinteza a 38 de compuși finali (5 dintre compușii finali au fost raportați anterior de alți autori, dar printr-un alt protocol de obținere).
- 3) Aplicarea unor procedee complementare de testare a efectului antiradicalic al compușilor studiați.
- 4) Realizarea de studii *in silico*, de predicție a proprietăților farmacocinetice, indispensabile stabilirii interesului unui compus pentru dezvoltarea preclinică și clinică.
- 5) Realizarea de studii de andocare moleculară și de dinamică moleculară pentru predicția mecanismului de acțiune la nivel molecular.

REFERINȚE

1. Plescia F, Maggio B, Daidone G, Raffa D. 4-(3H)-quinazolinones N-3 substituted with a five membered heterocycle: A promising scaffold towards bioactive molecules. *Eur J Med Chem.* 2021;213:113070.
2. Mravljak J, Slavec L, Hrast M, Sova M. Synthesis and Evaluation of Antioxidant Properties of 2-Substituted Quinazolin-4(3H)-ones. *Molecules.* 2021;26(21):6585.
3. Zahran SS, Ragab FA, El-Gazzar MG, Soliman AM, Mahmoud WR, Ghorab MM. Antiproliferative, antiangiogenic and apoptotic effect of new hybrids of quinazoline-4(3H)-ones and sulfachloropyridazine. *Eur J Med Chem.* 2023;245:114912.
4. Alsibae AM, Al-Yousef HM, Al-Salem HS. Quinazolinones, the Winning Horse in Drug Discovery. *Molecules.* 2023;28(3):978.
5. Riva A, Golda A, Balagura G, Amadori E, Vari MS, Piccolo G, et al. New Trends and Most Promising Therapeutic Strategies for Epilepsy Treatment. *Front Neurol.* 2021;12.
6. Chen J, Yang J, Ma L, Li J, Shahzad N, Kim CK. Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. *Sci Rep.* 2020;10(1):2611.
7. Pandiarajan D, Fox T, Spingler B. An N4-Tetradentate Hydrazone Ligand That Binds in a Neutral, Mono- and Bisdeprotonated Form to Iron(II) and Zinc(II) Metal Ions. *Crystals.* 2021;11(8):982.
8. Ahmad F, Alkahtani MDF, Taj MB, Alnajeebi AM, Alzahrani SO, Babteen NA, et al. Synthesis of New Naphthyl Aceto Hydrazone-Based Metal Complexes: Micellar Interactions, DNA Binding, Antimicrobial, and Cancer Inhibition Studies. *Molecules.* 2021;26(4):1044.
9. Marc G, Stana A, Oniga SD, Pîrnău A, Vlase L, Oniga O. New Phenolic Derivatives of Thiazolidine-2,4-dione with Antioxidant and Antiradical Properties: Synthesis, Characterization, In Vitro Evaluation, and Quantum Studies. *Molecules.* 2019;24(11):2060.
10. Ramadan SK, Elrazaz EZ, Abouzeid KAM, El-Naggar AM. Design, synthesis and in silico studies of new quinazolinone derivatives as antitumor PARP-1 inhibitors. *RSC Adv.* 2020;10(49):29475–92.
11. Muzza M, Pogliaghi G, Colombo C, Carbone E, Cirello V, Palazzo S, et al. Oxidative Stress Correlates with More Aggressive Features in Thyroid Cancer. *Cancers (Basel).* 2022;14(23):5857.
12. Pele R, Marc G, Stana A, Ionuț I, Nastasă C, Tiperchiu B, et al. Synthesis of New Phenolic Derivatives of Quinazolin-4(3H)-One as Potential Antioxidant Agents—In Vitro Evaluation and Quantum Studies. *Molecules.* 2022;27(8):2599.
13. Paliere E, Masse S, Laurent G, Le Griel P, Mosser G, Coradin T, et al. Synthesis of Hybrid Polyphenol/Hydroxyapatite Nanomaterials with Anti-Radical Properties. *Nanomaterials.* 2022;12(20):3588.
14. Momchilova A, Pankov R, Staneva G, Pankov S, Krastev P, Vassileva E, et al. Resveratrol Affects Sphingolipid Metabolism in A549 Lung Adenocarcinoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2022;23(18):10870.
15. Pop A, Fișeșan I, Vlase L, Rusu ME, Cherfan J, Babota M, et al. Enhanced Recovery of Phenolic and Tocopherolic Compounds from Walnut (*Juglans Regia* L.) Male Flowers Based on Process Optimization of Ultrasonic Assisted-Extraction: Phytochemical Profile and Biological Activities. *Antioxidants.* 2021;10(4):607.
16. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics,

- drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep.* 2017;7(1):42717.
17. Ertl P, Rohde B, Selzer P. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. *J Med Chem.* 2000;43(20):3714–7.
 18. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997). *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;46(1–3):3–26.
 19. Delaney JS. ESOL: Estimating Aqueous Solubility Directly from Molecular Structure. *J Chem Inf Comput Sci.* 2004;44(3):1000–5.
 20. Pele R, Marc G, Ionuț I, Nastasă C, Fizeșan I, Pîrnău A, et al. Antioxidant and Cytotoxic Activity of New Polyphenolic Derivatives of Quinazolin-4(3H)-one: Synthesis and In Vitro Activities Evaluation. *Pharmaceutics.* 2022;15(1):136.
 21. Ghit A, Assal D, Al-Shami AS, Hussein DEE. GABAA receptors: structure, function, pharmacology, and related disorders. *J Genet Eng Biotechnol.* 2021;19(1):123.
 22. Patel HM, Noolvi MN, Shirkhedkar AA, Kulkarni AD, Pardeshi C V, Surana SJ. Anti-convulsant potential of quinazolinones. *RSC Adv.* 2016;6(50):44435–55.
 23. De Simone G, Bua S, Supuran CT, Alterio V. Benzyl alcohol inhibits carbonic anhydrases by anchoring to the zinc coordinated water molecule. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;548:217–21.
 24. Pele R, Marc G, Mogoșan C, Apan A, Ionuț I, Tiperciuc B, et al. Synthesis, In Vivo Anticonvulsant Activity Evaluation and In Silico Studies of Some Quinazolin-4(3H)-One Derivatives. *Molecules.* 2024;29(9):1951.
 25. Łączkowski KZ, Sałat K, Misiura K, Podkowa A, Malikowska N. Synthesis and anticonvulsant activities of novel 2-(cyclopentylmethylene)hydrazinyl-1,3-thiazoles in mouse models of seizures. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2016;31(6):1576–82.
 26. Baias A, Cristina RT, Chiruciu V. Guidelines for euthanasia of laboratory animals used in biomedical research. *Vet Drug.* 2012;6(1):57–62.
 27. Antonie D, Michielin O, Zoete V. iLOGP: A Simple, Robust, and Efficient Description of n-Octanol/Water Partition Coefficient for Drug Design Using the GB/SA Approach. *J Chem Inf Model.* 2014;54(12):3284–3301.
 28. Valdés-Tresanco MS, Valdés-Tresanco ME, Valiente PA, Moreno E. AMDock: a versatile graphical tool for assisting molecular docking with Autodock Vina and Autodock4. *Biol Direct.* 2020;15(1):12.
 29. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2010;31(2):455–61.
 30. Kim JJ, Gharpure A, Teng J, Zhuang Y, Howard RJ, Zhu S, et al. Shared structural mechanisms of general anaesthetics and benzodiazepines. *Nature.* 2020;585(7824):303–8.
 31. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25(13):1605–12.
 32. Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng Des Sel.* 1995;8(2):127–34.

33. Laskowski RA, Swindells MB. LigPlot+: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *J Chem Inf Model*. 2011;51(10):2778–86.
34. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. 2015;1–2:19–25.
35. Vanommeslaeghe K, Hatcher E, Acharya C, Kundu S, Zhong S, Shim J, et al. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J Comput Chem*. 2010;31(4):671–90.
36. Shilkar D, Mohd Siddique MU, Bua S, Yasmin S, Patil M, Timiri AK, et al. Carbonic anhydrase inhibitory activity of phthalimide-capped benzene sulphonamide derivatives. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2023;38(1).
37. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph*. 1996;14(1):33–8.

PHD THESIS SUMMARY

Design, synthesis and biological activity evaluation of some new quinazolin-4-onic compounds

PhD Student **Raluca Pele**

PhD Supervisor Prof.dr. **Ovidiu Oniga**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENT

INTRODUCTION	3
STATE OF THE ART	3
PERSONAL CONTRIBUTION	3
1. Working hypothesis	3
2. Study 1 – Synthesis and antioxidant activity of new diphenolic quinazolin-4-one derivatives. <i>In vitro</i> and <i>in silico</i> evaluation	4
Introduction	4
Working hypothesis	4
Material and method	5
Results and discussions	5
Conclusions	6
3. Study 2 – New di/triphenolic quinazolin-4(3H)-ones. Rational design, synthesis, and evaluation of cytotoxic and antioxidant activity <i>in vitro</i> and <i>in silico</i>	6
Introduction	6
Working hypothesis	6
Material and method	6
Results and discussions	7
Conclusions	8
4. Study 3 – Synthesis and anticonvulsant activity of new quinazolin-4-one compounds. <i>In vivo</i> and <i>in silico</i> evaluation	8
Introduction	8
Working hypothesis	8
Material and method	8
Results and discussions	9
Conclusions	10
5. General conclusions	10
6. The originality and innovative contributions of the thesis	10
REFERENCES	10

Keywords: quinazolin-4(3H)-one, antioxidant, anticonvulsant, molecular docking, molecular dynamics

INTRODUCTION

Nowadays, research in medicinal chemistry follows a different vision in practice, applying *in silico* methods for rational drug design. The fast progression of computational approaches has reduced both time and financial costs by finding new therapeutic candidates with increased efficacy and fewer side effects compared to the available drugs on the pharmaceutical market.

By exposing this perspective, we proposed the chemical and pharmacological development of new compounds able to exert complex bioactivity by different derivatizations of a basic *scaffold*. The class of quinazolin-4(3H)-one derivatives has gained considerable research interest due to its varied biological properties, as highlighted in specialized literature. The purpose of this research was to identify leader molecules characterized by notable biological activity and pharmacokinetic profile, within each series of synthesized compounds.

In the first part of the thesis, the current state of the art in the field of chemistry and biological action of quinazolin-4-one compounds is presented. In the second part of this paper, the doctoral research is presented, and organized in three chapters. All studies used computational algorithms that facilitated the analysis of the results.

STATE OF THE ART

Quinazolin-4(3H)-one is a heterocyclic system consisting of a benzene ring condensed with 4-pyrimidinone. This bicyclic system is considered a representative basic structure called a *scaffold* in the medical chemistry-specific literature, being present in compounds with varied biological activity¹⁻⁴.

The progress of synthetic organic chemistry in the last decades has facilitated the obtaining of a diversity of quinazolin-4(3H)-one compounds, variously substituted in positions 2, 3, 5, 6, 7, and 8¹. The methods are presented in the doctoral thesis as conventional and modern methods for obtaining 2-substituted, 3-substituted, and 2,3-disubstituted 4(3H)-quinazolinones. The nature of the substituents in positions 2, 3, 5, 6, 7, and 8 influence the activity of quinazolin-4-ones differently and varied; substitution in positions 2 and 3 has a significant influence on biological activity.

The relevance of the topic discussed in this paper was evaluated through a bibliometric analysis carried out from 1993 to 2023, accessing the Web of Science database (WoS, Clarivate Analytics). This topic is currently of wide interest, with most publications in the previous year (2023), and one of the most intriguing biological activities within this research field is the antitumor one.

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Working hypothesis

The imperative demand for new compounds with antiradical properties, capable of neutralizing oxygen and nitrogen radical species involved in the

pathogenesis of diseases with very high morbidity and mortality (cancer or cardiovascular diseases), led the research, in a first stage, to a rational design and a synthesis project regarding the chemical development of several hybrid molecules of the quinazolin-4-one-linker-polyphenol type (the quinazolin-4-one heterocycle being the *scaffold* structure of the molecule). The linker (spacer) we chose is either a mercaptoacetohydrazonic residue or a mercaptoacetamide residue, which would allow the free rotation of the substituent in position 2 at the level of the C2 (from quinazolone)-S sigma bond. As a result, the molecules can achieve optimal conformations that enhance their biological effects.

On the other hand, another issue of interest in medical chemistry research is represented by the design and development of new anticonvulsant therapies ⁵. In the present work, we aimed to realize a rational design, chemical synthesis, and *in vivo* experiments for several quinazolin-4-one derivatives with novel chemical structures, in which the polyphenolic moieties have been replaced by non-hydroxylated, more lipophilic moieties.

The objectives of the research and the main activities that we realised in the doctoral research are: 1) the synthesis of new quinazolin-4-one derivatives based on a rational chemical and pharmacological design; 2) the physico-chemical characterization and spectral analysis of the obtained quinazolin-4-one compounds; 3) the *in vitro* evaluation of the antioxidant activity by applying antiradical tests based on electron transfer and chelation tests of some transition metals; 4) the *in silico* evaluation of the antioxidant activity by using quantum and thermodynamic descriptors; 5) the *in silico* evaluation of the molecular properties that influence the pharmacokinetics of the compounds; 6) the *in vitro* evaluation of the cytotoxicity of some of the obtained compounds; 7) the *in vivo* evaluation of the anticonvulsant activity by applying the convulsive model induced with pentylenetetrazol and the flumazenil antagonism test; 8) the *in silico* prediction of anticonvulsant activity by molecular docking studies and molecular dynamics simulations; 9) the *in silico* logP prediction of compounds with optimal anticonvulsant activity.

2. Study 1. Synthesis and antioxidant activity of new diphenolic quinazolin-4-one derivatives. *In vitro* and *in silico* evaluation

Introduction

The development of new therapeutic agents with antioxidant activity represents an important direction of research in the field of medicinal chemistry, since antioxidants (natural, semi-synthetic, or of total chemical synthesis) protect cells against reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), by releasing hydrogen atoms that neutralize them from the human organism. ⁶

Working hypothesis

The merging of two structural fragments (quinazolin-4-one with the role of *scaffold* and a diphenolic pharmacophore) through a thioacetohydrazonic linker could show a notable antioxidant activity. The choice of this linker was made for two

important concerns: the flexibility of the thio-methylene fragment in the linker structure, given by the sulfur atom and the sp³ hybridized carbon atom, and the rigidity of the hydrazide-hydrazone fragment (the other component of the linker structure), chosen for its chelating properties of some transition metal ions ^{7,8}. The final compounds are variously substituted in position 3 with alkyl residues (ethyl, respectively butyl), an aryl alkyl residue (benzyl), respectively an unsaturated aliphatic residue (allyl).

Material and method

Chemical synthesis, physicochemical, and spectral characterization

The chemical synthesis, physicochemical, and spectral characterization of 12 compounds, **5a-l**, obtained through a sequence of reactions (4 steps, starting from anthranilic acid and 4 isothiocyanates) are presented.

In vitro antioxidant, antiradical, and chelating activity assays

Using the UV-Vis spectrophotometer Jasco V-530 (Jasco International Co., Tokyo, Japan), the antioxidant or antiradical activity was evaluated, through a series of tests: antiradical (ABTS^{•+}, DPPH[•], NO[•] radical scavenging tests), based on electron transfer (FRAP, TAC, RP, CUPRAC tests) or chelation of transition metal ions (Fe²⁺, Cu²⁺).

Theoretical quantum and thermodynamic calculations

According to the specialized literature, the antioxidant structure-activity relationships can be described with the aid of some quantum and thermodynamic descriptors, respectively by the frontier orbital energy levels HOMO (The Highest Occupied Molecular Orbital) and LUMO (The Lowest Unoccupied Molecular Orbital). All theoretical studies presented were performed using protocols previously reported in the literature ⁹. Using Chimera 1.10.2, images representing the lowest energy conformations of the compounds were generated.

Results and discussions

Chemical synthesis, physicochemical, and spectral characterization

The raw material from which the chemical synthesis began was anthranilic acid, subjected to a condensation reaction with four isothiocyanates, by refluxing in ethanol, obtaining the 2-mercapto-4(3H)-quinazolinones **1a-d**, variously substituted in position 3 ¹⁰. Compounds **2a-d** were obtained by the S-alkylation reaction of compounds **1a-d** with ethyl bromoacetate. By the hydrazinolysis reaction of esters **2a-d** with hydrazine hydrate, in ethanol at room temperature, (4-quinazolin-2-yl)-thioacetohydrazides **3a-d** resulted. The final compounds **5a-l** were obtained by refluxing hydrazides **3a-d** with the hydroxylated benzaldehydes **4a-c** in ethanol. The analysis of IR, MS, ¹H-NMR, and ¹³C-NMR spectra revealed all the observed signals for the synthesized compounds: **1a-d**, **2a-d**, **3a-d**, and **5a-l**.

In vitro antioxidant, antiradical, and chelating activity assays

In the antiradical tests (ABTS^{•+}, DPPH[•] and NO[•]), compounds **5h**, **5j**, and **5k** showed a higher radical scavenging activity than that of the reference antioxidants

used (ascorbic acid, trolox, gentisic acid). By applying FRAP, TAC and CUPRAC assays, diphenolic derivatives **5a**, **5b**, **5d**, **5e**, **5g**, **5h**, **5j**, and **5k** were the most active compounds. The best chelating properties of transition metal ions (Fe^{2+} and Cu^{2+}) were demonstrated by 2,3-disubstituted catechol derivatives **5d** and **5j**, even though their activity was inferior to sodium EDTA.

Theoretical quantum and thermodynamic calculations

Analyzing the HOMO–LUMO gap, the lowest values were identified in the case of catechol derivatives – more precisely, in the case of the series of 2,3-disubstituted compounds (**5a**, **5d**, **5g**, and **5j**). Among the analyzed derivatives, the compounds that have a hydroxyl group grafted in position 2 on the phenyl residue have the strongest antioxidant activity.

Conclusions

Compounds **5h**, **5j**, and **5k** were shown to have an oxygen radical scavenging activity superior to the reference antioxidants used. Although the obtained results are more than encouraging, the study also has some limitations, since experimental models on cells and animals were not used, aspects that we propose to address in the future.

3. Study 2. New di/triphenolic quinazolin-4(3H)-ones. Rational design, synthesis, and evaluation of cytotoxic and antioxidant activity *in vitro* and *in silico*

Introduction

A current topic, intensively studied, is oxidative stress and its effects on the human body, mentioned in the previous study. Cancer is known to develop in three distinct stages: initiation, promotion, and progression. Oxidative stress is a factor that promotes any of these stages ¹¹.

Working hypothesis

Encouraged by the promising results from the previous study, in further research we proposed the rational design, chemical development, and evaluation of the cytotoxic activity associated with the antiradical properties of new quinazoline-linker-triphenolic molecules (series **7a-d**), respectively quinazoline-linker-diphenolics (series **8a-d**), which differ from those reported in study 1 ¹². In the series of compounds **8a-d**, the thioacetohydrazonic spacer contains an additional methyl residue which, we believe, may contribute to optimizing the lipophilic-hydrophilic balance of the compounds ^{13,14}. Additionally, the selection of the quinazolin-4(3H)-onic compound that exhibits the lowest toxicity on healthy cells, and an increased cytotoxicity against two cancer cell lines (A549 and LNCaP) was pursued.

Material and method

Chemical synthesis, physicochemical, and spectral characterization

The chemical synthesis, physicochemical, and spectral characterization of 8 compounds, **7a-d** and **8a-d**, starting from anthranilic acid and 4 isothiocyanates, are described.

In vitro antioxidant, antiradical, and chelating activity assays

The antioxidant, antiradical, or chelating activity was determined according to the protocols applied in the previous study.

Theoretical quantum and thermodynamic calculations

The antioxidant structure-activity relationships, determined as a result of the presence of some phenolic groups, can be described by applying the protocols presented in study 1.

In vitro cytotoxic activity assay

This experiment was performed on three cell lines: one of normal cells (BJ - human foreskin fibroblasts) and two of cancer cells (A549 - lung adenocarcinoma and LNCaP - prostate carcinoma), purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Cell viability was assessed by applying the Alamar Blue (AB) assay¹⁵. Statistical examination of the data was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) with a post hoc Holm-Sidak test. Graphical representation and data analysis were performed using SigmaPlot 11.0 software (Systat, Software Inc., Chicago, IL, USA). The results were considered to be statistically validated at values of $p < 0.05$.

Molecular properties that influence the pharmacokinetics of compounds

To obtain preliminary information on molecular properties that could influence the pharmacokinetics of compounds, the SwissADME platform was used¹⁶. The molecular properties evaluated were topological polar surface area (TPSA)¹⁷, octanol-water partition coefficient expressed as LogP¹⁸, solubility in water¹⁹, and Lipinski's 5 rules¹⁸.

Results and discussions

Chemical synthesis, physicochemical, and spectral characterization

By the condensation reaction of hydrazides **3a-d** with 2,3,4-trihydroxybenzaldehyde (**6a**) or with 2,4-dihydroxy-acetophenone (**6b**) 8 final compounds, **7a-d** and **8a-d**, were obtained. By analyzing the IR, MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra, all the observed vibrational signals were identified for the synthesized compounds **7a-d** and **8a-d**.

In vitro antioxidant, antiradical, and chelating activity assays

The antiradical and chelating potential of pyrogallol derivatives **7a-d** was superior to compounds **8a-d**.

Theoretical quantum and thermodynamic calculations

The HOMO-LUMO gap was higher in compounds **7a**, **7b**, **7c**, and **7d**, derived from pyrogallol, while compounds **8a**, **8b**, **8c**, and **8d**, derived from 2,4-dihydroxy-acetophenone showed lower values. We consider the functional group most likely to donate hydrogen atoms to be the phenolic OH in the *meta* position (the O-H₂ site), compared to the linker (found in the structure of compounds **7a**, **7b**, **7c**, and **7d**).

In vitro cytotoxic activity assay

Compounds **8a-d** induced greater cytotoxicity than the other compounds on A549 and LNCaP cell lines at lower concentrations, while compounds **7a-d** exerted

greater cytotoxicity at medium and high doses. The relative cell viability was significantly higher in normal cells compared to cancer cells after exposure to the synthesized compounds. The antioxidant activity is strongly influenced by the third phenolic group in the structure. The methyl group does not increase the antioxidant potential of the compounds but influences their cytotoxicity on the cell lines studied ²⁰.

Molecular properties that influence the pharmacokinetics of compounds

How the pharmacokinetic properties of compounds are influenced by the nature of the substituents follows the expected trend in medicinal chemistry and the design of new bioactive compounds.

Conclusions

Derivatives containing a pyrogallol residue in the structure (compounds **7a-d**) have better antioxidant activity than the reference antioxidants. In a therapeutic hypothesis, these compounds are cytocompatible with healthy tissue.

4. Study 3. Synthesis and anticonvulsant activity of new quinazolin-4-one compounds. *In vivo* and *in silico* evaluation

Introduction

The GABA_A receptors also have specific allosteric sites in their structure, through which GABA signaling can be indirectly influenced by allosteric modulators, such as barbiturates, benzodiazepines, neurosteroids, and anesthetics ²¹.

Working hypothesis

In the scientific studies conducted on methaqualone, a quinazolin-4-one compound with sedative-hypnotic properties, good anticonvulsant properties were noted, due to its quality as a positive allosteric modulator (PAM – Positive Allosteric Modulator) of the GABA_A receptor. Structure-activity relationship (SAR) studies have shown that, in order to exert antiepileptic activity, methaqualone and its analogs with quinazolin-4(3H)-one structure must satisfy certain structural requirements: the presence of the quinazolin-4(3H)-one heterocycle as hydrophobic domain, the N¹ nitrogen atom as an electron donor and the presence of the carbonyl group as a site where hydrogen bonds can be formed. Substituents in positions 2 and 3 are mainly responsible for the pharmacokinetic properties and anticonvulsant potential ²².

Starting from these observations, the aim of this study was the synthesis of new series of quinazolin-4-one derivatives with anticonvulsant potential by chemically modulating the 2 and 3 positions, optimizing the interaction with both the allosteric sites of the GABA_A receptor and the active carbonic anhydrase (CA). Substituents with less rigidity, an allyl residue (series "a"), and a benzyl residue (series "b") were introduced in position 3, for a deeper penetration into one of the hydrophobic pockets of the targets. Substituents in position 2 are represented by different S-methyl-keto-aryl or S-acetamide fragments, able to coordinate the zinc ion (Zn²⁺) in the active center of CA to obtain an inhibitory effect on it ²³.

Material and method

Chemical synthesis, physicochemical, and spectral characterization

A total of 18 quinazolin-4-one derivatives, grouped into two series, "a" and "b", were synthesized, characterized physicochemically, and spectrally. The raw materials that were the basis of the chemical synthesis were anthranilic acid and 2 isothiocyanates.

In vivo anticonvulsant activity assays

The laboratory animals were 6-10-week-old female white mice of the species *Mus musculus* (CD1), weighing between 25-35 g, procured from the Center for Experimental Medicine and Practical Skills (Biobase) of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca. The *in vivo* experiments (*the pentylenetetrazol (PTZ)-induced seizure model*, where the reference substances were diazepam and phenobarbital, and *the flumazenil antagonism test*) were performed after obtaining a favorable opinion from the Ethics Commission of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca and of the Cluj Sanitary Veterinary and Food Safety Directorate ²⁴⁻²⁶.

In silico studies

Applying the model implemented by Antonie et al. ²⁷ the lipophilicity of the tested compounds was determined by *LogP prediction*, using the SwissADME platform ¹⁶. *The molecular docking study* was conducted using AutoDock Tools, with a specially designed force field based on interactions involving the zinc ion ²⁸. A secondary study was also performed by molecular docking using AutoDock vina 1.2.1., with a docking space projected as the volume of a cube with sides $x = y = z = 2$, to confirm the results obtained ²⁹. The 3D structures of the target macromolecules were retrieved from the Protein Data Bank ³⁰. By using Chimera 1.10.2 software ³¹, molecular interactions between ligands and target macromolecules were generated, and the resulting complexes were highlighted by 2D interaction diagrams using LigPlot+ 2.2 software ^{32,33}. *Molecular dynamics simulations* of the compounds-carbonic anhydrase II complexes were achieved using the GROMACS 2023 software ³⁴, and the CHARMM36 force field ³⁵, by previously reported protocols in the specialized literature ³⁶. The evolution of the compounds-carbonic anhydrase complexes II was visualized using VMD 1.9.4 ³⁷.

Results and discussions

Chemical synthesis, physicochemical, and spectral characterization

Compounds **1a-9a** and **1b-9b** were obtained by the condensation of 3-allyl-2-mercaptoquinazolin-4(3H)-one or 3-benzyl-2-mercaptoquinazolin-4(3H)-one with α -bromoacetophenone derivatives, p-(α -bromoacetyl)-naphthalene and iodoacetamide. The IR, MS, ¹H-NMR, and ¹³C-NMR spectra of compounds **1a-9a** and **1b-9b** were characterized by the presence of all vibrational signals of interest.

In vivo anticonvulsant activity assays

Applying *the pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizure model* in mice, compounds **7a** and **8b** conferred 100% protection, with results similar to those of the reference agents. By *the flumazenil antagonism test*, the most active compounds (**7a**, **8b**) no longer demonstrated a good protective capacity against PTZ-induced seizures in mice,

suggesting a possible mechanism of action as positive allosteric modulators of the GABA_A receptor.

In silico studies

According to the *LogP prediction*, the compounds substituted in the 3-position of the quinazolin-4-one heterocycle with the benzyl residue (series "b") are more lipophilic than the compounds of the "a" series, substituted in the 3-position with allyl residue, suggesting a better ability to cross the blood-brain barrier to reach its target. The *in silico docking and molecular dynamics studies* showed a higher binding affinity to the GABA_A receptor of the "b" series compounds compared to the "a" series compounds, while the designed ligand-carbonic anhydrase II complexes were unstable over time for both series of compounds.

Conclusions

In the case of the tested compounds, we propose a mechanism of action at the GABA_A receptor level, as positive allosteric modulators based on *in silico* studies. However, additional affinity tests are needed to confirm this hypothesis.

5. General conclusions

In the present research, the chemical synthesis of 3 series of quinazolin-4-ones (a total of 38 final compounds) was made, 33 of them not previously reported in the specialized literature. The antioxidant activity (quinazolin-4-one diphenolic derivatives **5a-l**), antioxidant and cytotoxic activity (quinazolin-4(3H)-one di/triphenolic derivatives **7a-d** and **8a-d**), respectively the anticonvulsant activity (quinazolin-4-one non-phenolic-4-ones **1a-9a**, respectively **1a-9b**) were evaluated, by *in vitro*, *in vivo* and *in silico* tests. The main goal of the research was the discovery of new HIT or LEAD molecules, within the series of synthesized and tested compounds, which would respect as many of Lipinski's rules as possible.

6. The originality and innovative contributions of the thesis

We consider that the main elements of originality of the doctoral thesis are: 1) The rational design, in some cases computer-assisted, of new quinazolin-4-one compounds, variously substituted in positions 2 and 3. 2) Synthesis of 38 final compounds (5 of the final compounds were previously reported by other authors, but by a different obtaining protocol). 3) Complementary procedures for testing the anti-radical effect of the studied compounds. 4) *In silico* studies, for the prediction of pharmacokinetic properties, indispensable for establishing the interest of a compound for preclinical and clinical development. 5) Molecular docking and molecular dynamics studies to predict the mechanism of action at the molecular level.

REFERENCES

1. Plescia F, Maggio B, Daidone G, Raffa D. 4-(3H)-quinazolinones N-3 substituted with a five membered heterocycle: A promising scaffold towards bioactive molecules. *Eur J Med Chem.* 2021;213:113070.
2. Mravljak J, Slavec L, Hrast M, Sova M. Synthesis and Evaluation of Antioxidant Properties

- of 2-Substituted Quinazolin-4(3H)-ones. *Molecules*. 2021;26(21):6585.
3. Zahran SS, Ragab FA, El-Gazzar MG, Soliman AM, Mahmoud WR, Ghorab MM. Antiproliferative, antiangiogenic and apoptotic effect of new hybrids of quinazolin-4(3H)-ones and sulfachloropyridazine. *Eur J Med Chem*. 2023;245:114912.
 4. Alsibaee AM, Al-Yousef HM, Al-Salem HS. Quinazolinones, the Winning Horse in Drug Discovery. *Molecules*. 2023;28(3):978.
 5. Riva A, Golda A, Balagura G, Amadori E, Vari MS, Piccolo G, et al. New Trends and Most Promising Therapeutic Strategies for Epilepsy Treatment. *Front Neurol*. 2021;12.
 6. Chen J, Yang J, Ma L, Li J, Shahzad N, Kim CK. Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. *Sci Rep*. 2020;10(1):2611.
 7. Pandiarajan D, Fox T, Spingler B. An N4-Tetradentate Hydrazone Ligand That Binds in a Neutral, Mono- and Bisdeprotonated Form to Iron(II) and Zinc(II) Metal Ions. *Crystals*. 2021;11(8):982.
 8. Ahmad F, Alkahtani MDF, Taj MB, Alnajeebi AM, Alzahrani SO, Babteen NA, et al. Synthesis of New Naphthyl Aceto Hydrazone-Based Metal Complexes: Micellar Interactions, DNA Binding, Antimicrobial, and Cancer Inhibition Studies. *Molecules*. 2021;26(4):1044.
 9. Marc G, Stana A, Oniga SD, Pîrnău A, Vlase L, Oniga O. New Phenolic Derivatives of Thiazolidine-2,4-dione with Antioxidant and Antiradical Properties: Synthesis, Characterization, In Vitro Evaluation, and Quantum Studies. *Molecules*. 2019;24(11):2060.
 10. Ramadan SK, Elrazaz EZ, Abouzid KAM, El-Naggar AM. Design, synthesis and in silico studies of new quinazolinone derivatives as antitumor PARP-1 inhibitors. *RSC Adv*. 2020;10(49):29475–92.
 11. Muzza M, Pogliaghi G, Colombo C, Carbone E, Cirello V, Palazzo S, et al. Oxidative Stress Correlates with More Aggressive Features in Thyroid Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022;14(23):5857.
 12. Pele R, Marc G, Stana A, Ionuț I, Nastasă C, Tiperciuc B, et al. Synthesis of New Phenolic Derivatives of Quinazolin-4(3H)-one as Potential Antioxidant Agents—In Vitro Evaluation and Quantum Studies. *Molecules*. 2022;27(8):2599.
 13. Paliere E, Masse S, Laurent G, Le Griel P, Mosser G, Coradin T, et al. Synthesis of Hybrid Polyphenol/Hydroxyapatite Nanomaterials with Anti-Radical Properties. *Nanomaterials*. 2022;12(20):3588.
 14. Momchilova A, Pankov R, Staneva G, Pankov S, Krastev P, Vassileva E, et al. Resveratrol Affects Sphingolipid Metabolism in A549 Lung Adenocarcinoma Cells. *Int J Mol Sci*. 2022;23(18):10870.
 15. Pop A, Fizeșan I, Vlase L, Rusu ME, Cherfan J, Babota M, et al. Enhanced Recovery of Phenolic and Tocopherolic Compounds from Walnut (*Juglans Regia* L.) Male Flowers Based on Process Optimization of Ultrasonic Assisted-Extraction: Phytochemical Profile and Biological Activities. *Antioxidants*. 2021;10(4):607.
 16. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*. 2017;7(1):42717.
 17. Ertl P, Rohde B, Selzer P. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. *J Med Chem*. 2000;43(20):3714–7.
 18. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational

- approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997). *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;46(1-3):3-26.
19. Delaney JS. ESOL: Estimating Aqueous Solubility Directly from Molecular Structure. *J Chem Inf Comput Sci.* 2004;44(3):1000-5.
 20. Pele R, Marc G, Ionuț I, Nastasă C, Fizeșan I, Pîrnău A, et al. Antioxidant and Cytotoxic Activity of New Polyphenolic Derivatives of Quinazolin-4(3H)-one: Synthesis and In Vitro Activities Evaluation. *Pharmaceutics.* 2022;15(1):136.
 21. Ghit A, Assal D, Al-Shami AS, Hussein DEE. GABAA receptors: structure, function, pharmacology, and related disorders. *J Genet Eng Biotechnol.* 2021;19(1):123.
 22. Patel HM, Noolvi MN, Shirkhedkar AA, Kulkarni AD, Pardeshi C V, Surana SJ. Anti-convulsant potential of quinazolinones. *RSC Adv.* 2016;6(50):44435-55.
 23. De Simone G, Bua S, Supuran CT, Alterio V. Benzyl alcohol inhibits carbonic anhydrases by anchoring to the zinc coordinated water molecule. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;548:217-21.
 24. Pele R, Marc G, Mogoșan C, Apan A, Ionuț I, Tipericiu B, et al. Synthesis, In Vivo Anticonvulsant Activity Evaluation and In Silico Studies of Some Quinazolin-4(3H)-One Derivatives. *Molecules.* 2024;29(9):1951.
 25. Łączkowski KZ, Sałat K, Misiura K, Podkowa A, Malikowska N. Synthesis and anticonvulsant activities of novel 2-(cyclopentylmethylene)hydrazinyl-1,3-thiazoles in mouse models of seizures. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2016;31(6):1576-82.
 26. Baias A, Cristina RT, Chiurciu V. Guidelines for euthanasia of laboratory animals used in biomedical research. *Vet Drug.* 2012;6(1):57-62.
 27. Antonie D, Michielin O, Zoete V. iLOGP: A Simple, Robust, and Efficient Description of n-Octanol/Water Partition Coefficient for Drug Design Using the GB/SA Approach. *J Chem Inf Model.* 2014;54(12):3284-3301.
 28. Valdés-Tresanco MS, Valdés-Tresanco ME, Valiente PA, Moreno E. AMDock: a versatile graphical tool for assisting molecular docking with Autodock Vina and Autodock4. *Biol Direct.* 2020;15(1):12.
 29. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2010;31(2):455-61.
 30. Kim JJ, Gharpure A, Teng J, Zhuang Y, Howard RJ, Zhu S, et al. Shared structural mechanisms of general anaesthetics and benzodiazepines. *Nature.* 2020;585(7824):303-8.
 31. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25(13):1605-12.
 32. Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng Des Sel.* 1995;8(2):127-34.
 33. Laskowski RA, Swindells MB. LigPlot+: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *J Chem Inf Model.* 2011;51(10):2778-86.
 34. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX.* 2015;1-2:19-25.
 35. Vanommeslaeghe K, Hatcher E, Acharya C, Kundu S, Zhong S, Shim J, et al. CHARMM

- general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J Comput Chem.* 2010;31(4):671–90.
36. Shilkar D, Mohd Siddique MU, Bua S, Yasmin S, Patil M, Timiri AK, et al. Carbonic anhydrase inhibitory activity of phthalimide-capped benzene sulphonamide derivatives. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2023;38(1).
 37. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph.* 1996;14(1):33–8.