"VICTOR BABEȘ" UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY
TIMIȘOARA

DOCTORAL THESIS ABSTRACT

PENTACYCLIC TRITERPENES IN ANTICANCER RESEARCH: FROM PRECLINICAL EVIDENCE TO THE DEVELOPMENT OF NOVEL SEMISYNTHETIC DERIVATIVES

PhD Candidate: Ulici Loredana Alexandra

PhD Supervisor: Prof. Dr. Șoica Codruța

T I M I Ș O A R A
2 0 2 6

1. INTRODUCTION

Cancer is a complex disease, characterized by uncontrolled cell proliferation, invasiveness and metastasis, whose development is associated with genetic, lifestyle and environmental risk factors. It remains a major health concern, accounting for over 10 million deaths in 2020 and representing the second leading cause of mortality worldwide after cardiovascular diseases. Although the cancer mortality rates have generally declined in Europe, due to improvements in diagnosis and treatment, the incidence has continued to rise due to demographic aging and enhanced detection strategies. However, despite this progress, significant regional disparities in both incidence and mortality are still reported. For example, in Romania, the incidence of some types of cancer exceeds the European average, an effect associated with suboptimal screening, inconsistent adherence to treatment protocols, uneven distribution of healthcare professionals and treatment facilities across the country.

The anticancer treatment still relies on non-selective techniques like radiation, chemotherapy, and surgery, which are linked to systemic toxicity, tumor resistance, and unfavorable pharmacokinetics that limit treatment effectiveness. However, selective anticancer treatments are being developed, such as targeted chemotherapy, immunotherapy, and virus-based approaches.

In this regard, the structural complexity, accessibility, good safety profile, and multimodal mechanism of action of natural-origin compounds make them promising therapeutic agents. In several preclinical models, lupane-type triterpenes (Lup-TP) have shown both direct cytotoxicity and pleiotropic actions that increase the anticancer potential. Nevertheless, the high lipophilicity and poor bioavailability imprinted by the lupane scaffold limit the concentration of the chemical that reaches its molecular target, hence lowering cytotoxicity. Despite the fact that numerous approaches, such as chemical derivatization and complex nanoformulations, have demonstrated encouraging results in preclinical models, clinical translation is still restricted, indicating the necessity for additional Lup-TP improvement.

The thesis is structured into a general part and an experimental part. The general part presents an overview of Lup-TP, focusing on their structural characteristics, pharmacokinetics, toxicological profile, and anticancer activity in preclinical models.

Additionally, it presents strategies employed to enhance their anticancer efficacy, including combination therapies, nanocarrier-based approaches, and chemical derivatization, with particular emphasis on triazole functionalization.

The experimental part presents the synthesis and structural characterization of two novel series of triazole derivatives of betulin (Bet), C30-substituted (Bet-TZ1-4) and C3/C28-bistriazole (AP1-5). Their preliminary anticancer potential was evaluated through cytotoxicity, morphological and mechanistic assays. Furthermore, a comprehensive *in silico* investigation was conducted for the AP1-5 series, including network pharmacology, molecular docking, molecular dynamics simulations and ADMET predictions, to elucidate potential mechanisms of action and identify relevant molecular targets for the anticancer effect

2. AIMS AND OBJECTIVES

The present doctoral thesis proposes an optimization strategy for Bet, a widely used Lup-TP with anticancer potential, via triazole functionalization at key positions. The main objectives of this doctoral research are:

i. the synthesis and physicochemical characterization of novel Bet-1,2,4-triazole derivatives;

ii. the in vitro assessment of their anticancer potential;

iii. the *in silico* identification of potential molecular targets for the most promising compound series;

iv. the *in silico* ADMET evaluation of the lead derivative.

3. METHODOLOGY

The experimental methodology for this doctoral research is multidisciplinary, with chemical synthesis, physicochemical characterization, and multi-level biological and computational assessments. The methods were applied to two independent series of semisynthetic Bet derivatives functionalized with 1,2,4-triazoles: Bet-TZ1–4 (C30-substituted 1,2,4-triazole-3-thiol-betulin derivatives) and AP1–5 (C3,C28-bis-1,2,4-triazolyl-sulfanylacetate-betulin derivatives). The methods employed in this doctoral research are briefly described below.

Organic synthesis

The synthesis of Bet-TZ1-4 comprised three distinct steps:

i. acetylation at the C3-OH and C28-OH positions by reacting Bet with acetic anhydride to obtain 3,28-O-diacetyl-betulin;

ii. allylic bromination at the C30 position using N-bromosuccinimide (NBS) to obtain 3,28-O-diacetyl-30-bromo-betulin (Br-Bet);

iii. nucleophilic substitution of Br-Bet with 1,2,4-triazole-3-thiol or various 5-substituted-1,2,4-triazole-3-thiols to obtain the Bet-TZ1-4 series;

The synthesis of AP1-5 comprised two distinct steps:

i. Steglich esterification at both the C3-OH and C28-OH hydroxyl groups by Bet with chloroacetic acid to obtain betulin-3,28-O-di(chloroacetate) (Bet-(ClAc)2)

ii. alkylation of Bet-(ClAc)2 with 1,2,4-triazole-3-thiol and various various 5-substituted-1,2,4-triazole-3-thiols to obtain the AP1-5 series

Physicochemical characterization

The Bet-TZ1-4 and AP1-5 series were characterized through:

i. NMR and FTIR Spectroscopy

ii. Melting Point Determination

Biological assessment

i. Cytotoxicity assessment through Alamar blue assay: against A375-melanoma (Bet-TZ1-4 and AP1-5), MCF-7-breast cancer (Bet-TZ1-4 and AP1-5), HT-29-colorectal cancer (Bet-TZ1-4), PANC-1-pancreatic cancer (AP1-5) and HaCaT-normal keratinocytes (Bet-TZ1-4 and AP1-5 series) cell lines.

ii. Morphological assessment of apoptotic cells through immunofluorescence assay (Bet-TZ1, Bet-TZ3 and AP1-5)

iii. Scratch assay (Bet-TZ1 and Bet-TZ3)

iv. Caspase quantification: caspase-9 (Bet-TZ1-4), caspase-3/7 (AP1-5)

v. Reactive oxygen species determination (AP1-5)

vi. Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane assay (Bet-TZ1-4)

Computational assessment

i. Network Pharmacology: Target prediction for the AP1-5 series was performed to further determine hub proteins and enriched signalling pathways potentially involved in the anticancer effect of AP1-5.
ii. Molecular Docking: used to assess the binding affinity of AP5 against top targets identified through network pharmacology analysis.
iii. Molecular Dynamics Simulations: The 100 ns MDS was performed to assess the in silico stability of the AP5-MMP-2 complex, which showed the most favorable predicted binding affinity in the molecular docking analysis.
iv. ADMET Predictions: Physicochemical and ADMET predictions of AP5 compared to Bet.

4. RESULTS AND DISCUSSIONS

Two series of semisynthetic Bet-1,2,4-triazole derivatives (Bet-TZ1-4 and AP1-5) were obtained in moderate yields (30-41%) and their structures were further confirmed through $^{1}H/^{13}C$ NMR and FTIR spectroscopy.

The cytotoxicity of the first series (Bet-TZ1-4) was assessed against non-malignant HaCaT keratinocytes and three tumor cell lines (A375 melanoma, MCF-7 breast cancer, HT-29 colorectal cancer) using the Alamar Blue assay. Bet-TZ1, bearing the unsubstituted triazole, emerged as the most cytotoxic derivative, exceeding the effect of both the parent compound Bet and the reference drug 5-FU in A375, MCF-7 and HT-29 cells, with IC_{50} values of 22.41 μM, 33.52 μM and 46.92 μM, respectively. However, Bet-TZ1 also reduced HaCaT viability, indicating low selectivity. In contrast, Bet-TZ3, the p-chlorophenyl-substituted analogue, displayed a more favorable selectivity profile, remaining active mainly against melanoma cells (IC_{50}: 34.34 μM) compared to non-malignant keratinocytes, while Bet-TZ2 and Bet-TZ4 were essentially inactive across the tested panel.

The morphological analysis of cells treated with Bet-TZ1 and Bet-TZ3 revealed hallmarks consistent with apoptosis—nuclear condensation and fragmentation, cell rounding and detachment, and formation of apoptotic bodies. This pro-apoptotic mechanism was confirmed at the molecular level by RT-PCR quantification, which showed that both

derivatives upregulated caspase-9 expression above the level induced by Bet alone, in all tested cell line. The scratch assay further demonstrated that both compounds, and particularly Bet-TZ1, significantly reduced the migratory capacity of A375, MCF-7 and HT-29 cells relative to untreated controls, indicating an additional anti-invasive effect beyond direct cytotoxicity. Lastly, the HET-CAM irritation assay showed that Bet and Bet-TZ2-4 were non-irritant, while Bet-TZ1 induced only localized, minor hemorrhages without affecting embryo viability, overall supporting an acceptable local tolerability profile for the series.

The second series of Bet-1,2,4-triazoles, AP1-5, was tested against HaCaT, A375, MCF-7 and PANC-1 (pancreatic cancer) cells. Among the five derivatives, AP5—bearing two unsubstituted 1,2,4-triazole rings—was identified as the lead compound, showing potent and broad cytotoxicity across all cancer cell lines, with a notably low IC_{50} of 7.42 μM against MCF-7, outperforming Bet and approaching or exceeding the potency of doxorubicin in PANC-1 cells, while remaining considerably less toxic to non-malignant HaCaT cells. By contrast, the phenyl-substituted analogues (AP1-4) showed only moderate, dose-dependent cytotoxicity, with IC_{50} values exceeding 100 μM, highlighting that even small changes in the triazole substitution pattern can markedly influence anticancer potency—consistent with observations made for the Bet-TZ series.

Morphological assessment confirmed apoptosis-associated features, including nuclear fragmentation, cytoskeletal disorganization, cell rounding in A375, MCF-7 and PANC-1 cells treated with AP1-5, with no comparable changes in HaCaT cells at equivalent concentrations. Caspase-3/7 activation assays showed that all five derivatives significantly increased executioner caspase activity in A375 and MCF-7 cells, whereas only AP5 achieved significant activation in HaCaT and PANC-1 cells—an outcome attributed, in MCF-7, entirely to caspase-7 given the caspase-3 deficiency of this line. In parallel, ROS quantification revealed that AP1-5 significantly decreased intracellular ROS levels in A375 and MCF-7 cells, while leaving HaCaT ROS levels unaffected, suggesting that the antiproliferative effect of these derivatives may involve modulation of the cellular redox balance, in line with reports of similarly variable ROS effects for other Bet derivatives.

An integrated *in silico* investigation was used for Bet and the AP1-5 series to explore plausible mechanisms behind their anticancer activity. Target prediction for all six compounds was performed, with AP5 showing 104 potential targets, considerably more than Bet and AP1-4. Overlap analysis with melanoma-, breast- and pancreatic cancer-specific

proteins suggested that triazole functionalization can expand the target panel of Bet, thus potentially improving its cytotoxicity. Furthermore, among the predicted targets, nine hub targets emerged (IL2, IGF1, MMP2, ESR1, MDM2, JAK2, PGR, FGFR1, MAP2K1), each with established roles in breast cancer, melanoma or pancreatic cancer signaling, consistent with mechanisms reported for other pentacyclic triterpenes.

Global pathway enrichment of the pooled Bet/AP1-5 targets highlighted core oncogenic pathways—PI3K/Akt signaling, EGFR-resistance, proliferation and apoptosis pathways—along with melanoma- and breast cancer-specific routes, suggesting AP1-5 collectively engage a broader pathway range than Bet, although only AP5 showed superior in vitro cytotoxicity.

Molecular docking was used to directly assess the binding affinity of AP5 on its top predicted hub targets (ESR1, IGF1, MAP2K1, IL2, MDM2, MMP2, PGR), with MMP-2 showing the most favorable score. Prime MM-GBSA analysis supported this binding, justifying the selection of the AP5–MMP-2 complex for molecular dynamics simulation. Over a 100-ns MDS run, the complex showed an initial adaptation phase followed by a largely stable trajectory, indicating reserved ligand conformation despite some repositioning within the pocket. These findings reinforce MMP-2 as a biologically plausible target for AP5, consistent with reported antimetastatic, MMP-2/9-related mechanisms of other pentacyclic triterpenes, pending experimental validation.

The *in silico* ADMET prediction analysis indicated that AP5 possesses acceptable intestinal absorption, is not a P-glycoprotein substrate, and shows low predicted blood–brain barrier penetration, an advantage for a non-central nervous system-targeted anticancer agent. AP5 also displayed increased microsomal stability and a longer predicted half-life relative to Bet, alongside several predicted toxicity risks that, in line with the known limitations of *in silico* toxicity models for structurally complex natural derivatives, will require experimental confirmation.

5. CONCLUSIONS

This doctoral thesis aimed to optimize the therapeutic profile of Bet, a widespread Lup-TP with therapeutic potential due to its multimodal mechanism of action, but limited by low systemic bioavailability, which has so far constrained its clinical development.

The four objectives established for this doctoral research have been achieved through a multi-approach strategy combining chemical, biological and computational techniques, as follows:

i. The synthesis and physicochemical characterization of novel Bet-1,2,4-triazole derivatives: Two series of Bet-1,2,4-triazole derivatives, C30-1,2,4-triazolyl-diacetyl-Bet (Bet-TZ1-4) and C3/C28-bis-1,2,4-triazolyl-sulfanylacetate-Bet (AP1-5), were successfully synthesized and structurally characterized by NMR and FTIR spectroscopy.

ii. The *in vitro* assessment of their anticancer potential: The preliminary cytotoxicity of the synthesized derivatives was assessed in vitro against the human non-tumor HaCaT (keratinocytes) cell line and tumor cell lines, including A375 (melanoma), MCF-7 (breast cancer), HT-29 (colorectal cancer), and PANC-1 (pancreatic cancer). The biological assessment revealed AP5 as the lead derivative due to superior cytotoxicity in tested cell lines (IC_{50}: 7.41 μM in MCF-7, IC_{50}: 20.36 μM in A375 and IC_{50}: 20.92 μM in PANC-1). The mechanistic investigations revealed that AP5 triggered apoptosis, marked by specific apoptotic markers and an increase in the executioner caspases, caspase-3 and -7.

iii. The *in silico* identification of potential molecular targets for the most promising compound series: The potential molecular targets of the AP1-5 series were predicted through an integrated computational approach, revealing 9 potential targets relevant for the types of cancer investigated, namely IL2, IGF1, MMP2, ESR1, MDM2, JAK2, PGR, FGFR1 and MAP2K1. Among them, MMP-2 was validated through molecular docking and 100 ns molecular dynamics simulations as a primary potential target for AP5, the lead derivative.

iv. The *in silico* ADMET evaluation of the lead derivative: The ADMET predictions for AP5 suggest favorable drug-like properties, including acceptable intestinal absorption, non-P-glycoprotein substrate, and reduced hepatic clearance compared to Bet. However, the predicted toxicity highlighted some potential risks such as genotoxicity, carcinogenicity and skin sensitization.

Although the objectives of the present doctoral research have been achieved, providing valuable information on the anticancer potential of the newly synthesized Bet-1,2,4-triazole derivatives, further studies are required to fully assess the biological effects, in particular for AP5, the lead derivative. Therefore, the following research directions are proposed:

• the anticancer assessment of AP5 in other breast cancer cell lines, such as MDA-MB-231 and SK-BR-3;

• the biological validation of the in silico molecular targets predicted, particularly the interaction of AP5 with MMP-2;

• the elucidation of the molecular mechanisms underlying the anticancer activity of AP5 in breast cancer

• the assessment of the anticancer efficacy and safety of AP5 *in ovo* and *in vivo*;

• the enhancement of the therapeutic efficacy of AP5 through the development of suitable drug delivery systems such as cyclodextrins and liposomes.

• the synthesis and evaluation of new Bet-1,2,4-triazole analogues with therapeutic potential

6. ORIGINAL CONTRIBUTIONS

The main original contributions of the current doctoral research:

• synthesis and chemical characterization of nine novel Bet-1,2,4-triazole derivatives (Bet-TZ1-4 and AP1-5);

• the first in vitro cytotoxicity and mechanistic screening of the synthesized derivatives (Bet-TZ1-4 and AP1-5) against a panel of tumor cell lines, identifying AP5 as a lead derivative which exhibited a remarkable IC_{50} value of 7.42 μM against MCF-7 (breast cancer cell line);

• the preliminary *in vitro* screening of the synthesized derivatives (Bet-TZ1-4 and AP1-5) against a normal cell line, HaCaT (human keratinocytes);

• the *in silico* identification of potential targets of the AP series (AP1–5), with MMP-2 predicted as a potential lead target of AP5 based on molecular docking and molecular dynamics simulations;

• the *in silico* evaluation of the ADMET profile of AP5, the lead derivative of the series.

7. LIST OF PUBLICATIONS

Articles in ISI indexed journals

1. **Prodea, A.**; Mioc, M.; Munteanu, A.; Mioc, A.; Paşcalău, N.A.; Mara, B.-I.; Atyim, E.; Balan-Porcarasu, M.; Racoviceanu, R.; Șoica, C. Novel C3/C28-bis-1,2,4-triazolyl-

sulfanylacetate- betulin Derivatives: Synthesis and Evaluation of Anticancer Potential. Int. J. Mol. Sci. 2026, 27, 5960. https://doi.org/10.3390/ijms27135960; Impact Factor (2025): 5.6;

2. **Prodea A.**, Munteanu A., Jorgovan M., Batrina O., Mioc M., Soica I., Trandafirescu C. and Soica C. Triterpenes in breast cancer: a systematic review of preclinical evidence in rodents. Front. Pharmacol. 2025, 16:1623772. doi: 10.3389/fphar.2025.1623772; Impact Factor (2025): 5.4;

3. **Prodea, A.**; Milan, A.; Mioc, M.; Mioc, A.; Oprean, C.; Racoviceanu, R.; Negrea-Ghiulai, R.; Mardale, G.; Avram, Ș.; Bălan Porcărașu, M.; Rotunjanu, S.; Trandafirescu, C.; Șoica, I. and Soica C. Novel Betulin-1,2,4-Triazole Derivatives Promote In Vitro Dose-Dependent Anticancer Cytotoxicity. Processes 2024, 12, 24. https://doi.org/10.3390/pr12010024; Impact Factor (2024): 2.8;

4. **Prodea, A.**; Mioc, A.; Banciu, C.; Trandafirescu, C.; Milan, A.; Racoviceanu, R.; Ghiulai, R.; Mioc, M.; Soica, C. The Role of Cyclodextrins in the Design and Development of Triterpene-Based Therapeutic Agents. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 736, doi:10.3390/ijms23020736; Impact Factor (2022): 5.6;

5. Mioc, M.†; **Prodea, A.†**; Racoviceanu, R.; Mioc, A.; Ghiulai, R.; Milan, A.; Voicu, M.; Mardale, G.; Șoica, C. Recent Advances Regarding the Molecular Mechanisms of Triterpenic Acids: A Review (Part II). Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 8896, doi:10.3390/ijms23168896; †: equal contribution with the first author; Impact Factor (2022): 5.6.

Presentations at national and international conferences and webinars

1. **Prodea, A.**; Eşanu, O.; Mioc, M.; Șoica, C. Synthetically Enhanced Betulin-Based Triazoles as Promising Anticancer Agents. International Conference on Interdisciplinary Approaches and Emerging Trends in Pharmaceutical Doctoral Research: Innovation and Integration, Timișoara, 7-9 July 2025, Proceedings 2025, 127, 12. https://doi.org/10.3390/proceedings2025127012

2. **Prodea, A.**; Milan, A.; Mioc, M.; Racoviceanu, R.; Trandafirescu, C.; Mioc, A.; Pârvănescu, R.; Ghiulai; R.; Mardale; G.; Șoica, C.; Chemical heterocyclic derivatization of pentacyclic triterpenes- a promising strategy for drug development; Workshop New trends in pharmaceutical research; Timișoara 31.03.2023; p. 37-38

3. **Ulici, A.**; Milan, A.; Racoviceanu, R.; Ghiulai, R.; Mioc, M.; Soica, C.; Docking based drug-cyclodextrin complex design, for pentacyclic triterpenes formulation. Scholars International Webinar on Pharmacology and Toxicology THEME: "Novel insights in Therapeutic Approaches in Pharmacology and Toxicology", Webinar 14-15 April 2021

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „VICTOR BABEȘ”
TIMIȘOARA

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

TRITERPENE PENTACICLICE ÎN CERCETAREA ANTICANCEROASĂ: DE LA DOVEZILE PRECLINICE LA DEZVOLTAREA UNOR NOI DERIVAȚI SEMISINTETICI

Doctorand: Ulici Loredana Alexandra

Conducător de doctorat: Prof. Dr. Șoica Codruța

T I M I Ș O A R A
2 0 2 6

1. INTRODUCERE

Cancerul este o boală complexă, caracterizată prin proliferarea necontrolată a celulelor canceroasem a cărei dezvoltare este asociată cu factori de risc genetici, legați de stilul de viață și de mediu. Acesta rămâne o preocupare majoră în domeniul sănătății, fiind responsabil pentru peste 10 milioane de decese în 2020 și reprezentând a doua cauză de mortalitate la nivel mondial, după bolile cardiovasculare. Deși rata de mortalitate a cancerului a scăzut în general în Europa, datorită îmbunătățirilor în materie de diagnostic și tratament, incidența a continuat să crească din cauza îmbătrânirii populației și a metodelor îmbunătățite de diagnostic. Cu toate acestea, în ciuda acestor progrese, se semnalează în continuare diferențe regionale semnificative atât în ceea ce privește incidența, cât și mortalitatea. De exemplu, în România, incidența anumitor tipuri de cancer depășește media europeană, un fenomen asociat cu screeningul suboptimal, aderența inconsecventă la tratament, precum și distribuția inegală a personalului medical și a unităților de tratament pe teritoriul țării.

Tratamentul împotriva cancerului se bazează în continuare pe tehnici neselective, precum radioterapia, chimioterapia și intervenția chirurgicală, care sunt asociate cu toxicitate sistemică, rezistența la tratament și farmacocinetică nefavorabilă, ceea ce limitează eficacitatea tratamentului. Cu toate acestea, se dezvoltă tratamente selective împotriva cancerului, precum chimioterapia țintită, imunoterapia și abordările bazate pe viruși.

În acest context, complexitatea structurală, accesibilitatea, profilul de siguranță bun și mecanismul de acțiune multimodal al compușilor de origine naturală îi fac agenți terapeutici promițători. În mai multe modele preclinice, triterpenele de tip lupan (Lup-TP) au demonstrat atât citotoxicitate directă, cât și acțiuni pleiotropice care sporesc potențialul anticanceros. Cu toate acestea, lipofilitatea ridicată și biodisponibilitatea redusă, determinate de scheletul lupanic, limitează concentrația substanței chimice care ajunge la ținta sa moleculară, reducând astfel citotoxicitatea. În ciuda faptului că numeroase abordări, precum derivatizarea chimică și nanoformulările complexe, au demonstrat rezultate încurajatoare în modelele preclinice, transpunerea în practica clinică este încă limitată, ceea ce indică necesitatea îmbunătățirii suplimentare a Lup-TP.

Teza este structurată într-o parte generală și o parte experimentală. Partea generală prezintă o imagine de ansamblu asupra Lup-TP, concentrându-se pe caracteristicile lor structurale, farmacocinetica, profilul toxicologic și activitatea anticanceroasă în modele preclinice. În plus, prezintă strategiile utilizate pentru a spori eficacitatea lor anticanceroasă, inclusiv terapiile combinate, abordările bazate pe nanopurtători și derivatizarea chimică, cu accent special pe funcționalizarea cu triazol.

Partea experimentală prezintă sinteza și caracterizarea structurală a două serii noi de derivați de triazol ai betulinei, cei substituiți în poziția C30 (Bet-TZ1-4) și cei de tip bistriazol C3/C28 (AP1-5). Potențialul lor anticanceros a fost evaluat prin teste de citotoxicitate, morfologice și mecaniciste. În plus, a fost efectuată o investigație *in silico* pentru seria AP1-5, incluzând farmacologia de rețea, andocarea moleculară, simulări de dinamică moleculară și predicții ADMET, pentru a elucida potențialele mecanisme de acțiune și a identifica ținte moleculare relevante pentru efectul anticanceros.

2. OBIECTIVE

Prezenta teză de doctorat propune o strategie de optimizare a Bet, o Lup-TP utilizat pe scară largă cu potențial anticanceros, prin funcționalizarea cu triazol în poziții-cheie. Principalele obiective ale acestei cercetări doctorale sunt:

i. sinteza și caracterizarea fizico-chimică a unor derivați noi ai Bet cu 1,2,4-triazol;

ii. evaluarea *in vitro* a potențialului lor anticanceros;

iii. identificarea *in silico* a potențialelor ținte moleculare pentru seria de compuși mai promițătoare;

iv. evaluarea ADMET *in silico* a celui mai promițător derivat.

3. METODOLOGIE

În realizarea acestei cercetări doctorale s-a utilizat o o abordare metodologică multidisciplinară, incluzând sinteza chimică, caracterizarea fizico-chimică, evaluări biologice și computationale. Metodele au fost aplicate celor două serii independente de derivați Bet semisintetici funcționalizați cu 1,2,4-triazoli: Bet-TZ1–4 (derivați ai betulinei cu 1,2,4-triazol-3-tiol substituit în poziția C30) și AP1–5 (derivați ai betulinei cu bis-1,2,4-triazolil-sulfanilacetat în pozițiile C3 și C28). Metodele utilizate în această cercetare doctorală sunt descrise pe scurt mai jos.

Sinteza chimică

Sinteza compușilor Bet-TZ1–4 a cuprins trei etape distincte:

i acetilarea în pozițiile C3-OH și C28-OH prin reacția Bet cu anhidridă acetică pentru a obține 3,28-O-diacetil-betulină;

ii. bromurarea alilică în poziția C30 folosind N-bromosuccinimidă (NBS) pentru a obține 3,28-O-diacetil-30-bromo-betulină (Br-Bet);

iii. substituția nucleofilă a Br-Bet cu 1,2,4-triazol-3-tiol și cu diverși 1,2,4-triazol-3-tioli substituiți în poziția 5, pentru a obține seria Bet-TZ1-4.

Sinteza compușilor AP1-5 a cuprins două etape distincte:

i. esterificarea Steglich la ambele grupări hidroxil C3-OH și C28-OH prin Bet cu acid cloroacetic pentru a obține betulin-3,28-O-di(cloroacetat) (Bet-(ClAc)2);

ii. alchilarea Bet-(ClAc)2 cu 1,2,4-triazol-3-tiol și cu diverși 1,2,4-triazol-3-tioli substituiți în poziția 5, pentru a obține seria AP1-5.

Caracterizarea fizico-chimică

Seriile Bet-TZ1-4 și AP1-5 au fost caracterizate prin:

i. Spectroscopie RMN și FTIR

ii. Determinarea punctului de topire

Evaluare biologică

i. Evaluarea citotoxicității prin testul Alamar Blue: îm linii celulare de melanom- A375 (Bet-TZ1-4 și AP1-5), cancer de sân- MCF-7 (Bet-TZ1-4 și AP1-5), cancer colorectal- HT-29 (Bet-TZ1-4), cancer pancreatic- PANC-1 (AP1-5) și keratinocite normale HaCaT (seriile Bet-TZ1-4 și AP1-5).
ii. Evaluarea morfologică a celulelor apoptotice prin testul de imunofluorescență (Bet-TZ1, Bet-TZ3 și AP1-5)
iii. Testul „scratch” (Bet-TZ1 și Bet-TZ3)
iv. Cuantificarea caspazelor: caspaza-9 (Bet-TZ1-4), caspaza-3/7 (AP1-5)
v. Determinarea speciilor reactive de oxigen (AP1-5)
vi. Testul HET-CAM pentru a determina potențialul iritiativ (Bet-TZ1-4)

Evaluarea computațională

i. Farmacologie de rețea: s-a efectuat predicția țintelor pentru seria AP1-5 pentru a identifica în continuare proteinele hub și potențiale căi de semnalizare implicate în efectul anticanceros al AP1-5.

ii. Andocare moleculară: utilizată pentru a evalua afinitatea de legare a AP5 față de țintele principale identificate prin analiza de farmacologie de rețea.

iii. Simulări de dinamică moleculară: S-a efectuat o simulare de 100 ns pentru a evalua stabilitatea *in silico* a complexului AP5-MMP-2, care a prezentat cea mai favorabilă afinitate de legare prevăzută în analiza de andocare moleculară.

iv. Predicții ADMET: predicții fizico-chimice și ADMET ale AP5 comparativ cu Bet.

4. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Au fost obținute două serii de derivați semisintetici ai Bet-1,2,4-triazolului (Bet-TZ1-4 și AP1-5) cu randamente moderate (30-41%), iar structurile acestora au fost confirmate ulterior prin spectroscopie RMN $^{1}H/^{13}C$ și FTIR.

Citotoxicitatea primei serii de compuși (Bet-TZ1-4) a fost evaluată pe keratinocite HaCaT nemaligne și pe trei linii celulare tumorale (melanom A375, cancer de sân MCF-7, cancer colorectal HT-29) folosind testul Alamar Blue. Bet-TZ1, care conține triazolul nesubstituit, s-a dovedit a fi cel mai citotoxic derivat, depășind efectul atât al compusului părinte Bet, cât și al medicamentului de referință 5-FU în celulele A375, MCF-7 și HT-29, cu valori IC_{50} de 22,41 μM, 33,52 μM și, respectiv, 46,92 μM. Cu toate acestea, Bet-TZ1 a redus și viabilitatea celulelor HaCaT, indicând o selectivitate scăzută. În schimb, Bet-TZ3, analogul substituit cu p-clorfenil, a prezentat un profil de selectivitate mai favorabil, rămânând activ în principal împotriva celulelor de melanom (IC_{50}: 34,34 μM) în comparație cu keratinocitele nemaligne, în timp ce Bet-TZ2 și Bet-TZ4 au fost practic inactive în cadrul panelului testat.

Analiza morfologică a celulelor tratate cu Bet-TZ1 și Bet-TZ3 a relevat semne caracteristice compatibile cu apoptoza — condensarea și fragmentarea nucleară, rotunjirea și desprinderea celulelor, precum și formarea corpurilor apoptotice. Acest mecanism proapoptotic a fost confirmat la nivel molecular prin cuantificarea RT-PCR, care a arătat că ambii derivați au crescut expresia caspazei-9 , peste nivelul indus de Bet, în toate liniile celulare testate. Testul Scrath a demonstrat în plus că ambii compuși, și în special Bet-TZ1, au redus semnificativ capacitatea de migrare a celulelor A375, MCF-7 și HT-29 în

comparație cu martorii netratați, indicând un efect antiinvaziv suplimentar, dincolo de citotoxicitatea directă. În cele din urmă, testul de iritație HET-CAM a arătat că Bet și Bet-TZ2-4 nu au prezentat efect iritativ, în timp ce Bet-TZ1 a indus doar hemoragii minore, localizate, fără a afecta viabilitatea embrionilor, ceea ce susține, în ansamblu, un profil acceptabil de tolerabilitate locală pentru această serie.

A doua serie de Bet-1,2,4-triazoli, AP1-5, a fost testată împotriva celulelor HaCaT, A375, MCF-7 și PANC-1 (cancer pancreatic). Dintre cei cinci derivați, AP5 — care conține două inele 1,2,4-triazol nesubstituite — a fost identificat ca cel mai promițător derivat, prezentând o citotoxicitate puternică și cu spectru larg asupra tuturor liniilor celulare canceroase, cu o valoare IC_{50} de 7,42 μM împotriva liniei MCF-7, depășind Bet și apropiindu-se (în MCF-7 și A375) sau depășind potența doxorubicinei în celulele PANC-1, rămânând în același timp considerabil mai puțin toxic pentru celulele HaCaT nemaligne. În schimb, analogii substituiți cu fenil (AP1-4) au prezentat doar o citotoxicitate moderată, dependentă de doză, cu valori ale IC_{50} care depășeau 100 μM, evidențiind faptul că chiar și mici modificări ale modelului de substituție al triazolului pot influența semnificativ potența anticanceroasă — în concordanță cu observațiile făcute pentru seria Bet-TZ.

Evaluarea morfologică a confirmat caracteristici asociate apoptozei, inclusiv fragmentarea nucleară, dezorganizarea citoscheletului și rotunjirea celulelor în celulele A375, MCF-7 și PANC-1 tratate cu AP1-5, fără modificări comparabile în celulele HaCaT la concentrații echivalente. Testele de activare a caspazelor-3/7 au arătat că toți cei cinci derivați au crescut semnificativ activitatea caspazelor executante în celulele A375 și MCF-7, în timp ce doar AP5 a obținut o activare semnificativă în celulele HaCaT și PANC-1 — un rezultat atribuit, în cazul liniei MCF-7, în întregime caspazei-7, având în vedere deficiența genetică de caspază-3 a acestei linii. În paralel, cuantificarea ROS a relevat că AP1-5 a redus semnificativ nivelurile intracelulare de ROS în celulele A375 și MCF-7, fără a afecta însă nivelurile de ROS din celulele HaCaT, ceea ce sugerează că efectul antiproliferativ al acestor derivați ar putea implica modularea echilibrului redox celular, în concordanță cu rapoartele privind efectele variabile similare asupra ROS pentru alți derivați ai Bet.

S-a utilizat o investigație *in silico* pentru Bet și seria AP1-5, în vederea explorării mecanismelor plauzibile care stau la baza activității lor anticanceroase. S-a efectuat predicția țintelor pentru toți cei șase compuși, AP5 prezentând 104 ținte potențiale, un număr considerabil mai mare decât Bet și AP1-4. Analiza suprapunerii cu proteinele specifice

melanomului, cancerului de sân și cancerului pancreatic a sugerat că funcționalizarea cu triazol poate extinde panelul de ținte al Bet, îmbunătățind astfel potențial citotoxicitatea acestuia. În plus, printre țintele prezise au apărut nouă ținte centrale (IL2, IGF1, MMP2, ESR1, MDM2, JAK2, PGR, FGFR1, MAP2K1), fiecare având roluri stabilite în semnalizarea cancerului de sân, a melanomului sau a cancerului pancreatic, în concordanță cu mecanismele raportate pentru alte triterpene pentaciclice.

Îmbogățirea (enrichment) a căilor de semnalizare a țintelor combinate Bet/AP1-5 a evidențiat căi oncogene esențiale — semnalizarea PI3K/Akt, rezistența la EGFR, căile de proliferare și de apoptoză — alături de căi specifice melanomului și cancerului de sân, sugerând că AP1-5 implică colectiv o gamă mai largă de căi decât Bet, deși numai AP5 a prezentat o citotoxicitate *in vitro* superioară.

S-a utilizat andocarea moleculară pentru a evalua direct afinitatea de legare a AP5 la principalele sale ținte prevăzute (ESR1, IGF1, MAP2K1, IL2, MDM2, MMP2, PGR), MMP-2 înregistrând cel mai favorabil scor. Analiza Prime MM-GBSA a confirmat această legare, justificând selectarea complexului AP5–MMP-2 pentru simularea dinamicii moleculare. Pe parcursul unei simulări de dinamică moleculară (MDS) de 100 ns, complexul a prezentat o fază inițială de adaptare, urmată de o traiectorie în mare parte stabilă, în ciuda unor repoziționări în interiorul buzunarului de legare. Aceste constatări consolidează statutul MMP-2 ca țintă biologic plauzibilă pentru AP5, în concordanță cu mecanismele antimetastatice raportate, legate de MMP-2/9, ale altor triterpene pentaciclice, dar validarea experimentală este necesară pentru confirmarea acestui efect.

Analiza de predicție ADMET *in silico* a indicat că AP5 prezintă o absorbție intestinală acceptabilă, nu este un substrat al P-glicoproteinei și prezintă o penetrare prevăzută scăzută a barierei hematoencefalice, un avantaj pentru un agent anticancer care nu vizează sistemul nervos central. AP5 a prezentat, de asemenea, o stabilitate microsomală crescută și un timp de înjumătățire prevăzut mai lung în comparație cu Bet, alături de mai multe riscuri de toxicitate prevăzute care, în conformitate cu limitările cunoscute ale modelelor de toxicitate *in silico* pentru derivații naturali cu structură complexă, vor necesita confirmare experimentală.

5. CONCLUZII

Această teză de doctorat a avut ca scop optimizarea profilului terapeutic al Bet, un Lup-TP răspândit cu potențial terapeutic datorită mecanismului său de acțiune multimodal, dar limitat de biodisponibilitatea sistemică scăzută, care i-a restricționat până în prezent dezvoltarea clinică.

Cele patru obiective stabilite pentru această cercetare doctorală au fost atinse printr-o strategie cu abordare multiplă, care a combinat tehnici chimice, biologice și computationale, după cum urmează:

i. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a unor derivați noi ai Bet-1,2,4-triazolului: Două serii de derivați Bet-1,2,4-triazol, C30-1,2,4-triazolil-diacetil-Bet (Bet-TZ1-4) și C3/C28-bis-1,2,4-triazolil-sulfanilacetat-Bet (AP1-5), au fost sintetizate cu succes și caracterizate structural prin spectroscopie RMN și FTIR.

ii. Evaluarea in vitro a potențialului lor anticancerigen: Citotoxicitatea preliminară a derivaților sintetizați a fost evaluată *in vitro* împotriva liniei celulare umane non-tumorale HaCaT (keratinocite) și a liniilor celulare tumorale, inclusiv A375 (melanom), MCF-7 (cancer de sân), HT-29 (cancer colorectal) și PANC-1 (cancer pancreatic). Evaluarea biologică a indicat AP5 ca derivat principal datorită citotoxicității superioare în liniile celulare testate (IC_{50}: 7,41 μM în MCF-7, IC_{50}: 20,36 μM în A375 și IC_{50}: 20,92 μM în PANC-1). Cercetările mecaniciste au arătat că AP5 a declanșat apoptoza, marcată de markeri specifici ai apoptozei și de o creștere a caspazelor executante (caspazele-3 și -7).

iii. Identificarea *in silico* a potențialelor ținte moleculare pentru cele mai promițătoare serii de compuși: Potențialele ținte moleculare ale seriei AP1-5 au fost prezise printr-o abordare computațională integrată, identificându-se 9 ținte potențiale relevante pentru tipurile de cancer investigate, și anume IL2, IGF1, MMP2, ESR1, MDM2, JAK2, PGR, FGFR1 și MAP2K1. Dintre acestea, MMP-2 a fost validată prin andocare moleculară și simulări de dinamică moleculară de 100 ns ca țintă potențială principală pentru AP5, derivatul principal.

iv. Evaluarea ADMET *in silico* a derivatului principal: Predicțiile ADMET pentru AP5 sugerează proprietăți favorabile similare celor ale medicamentelor, inclusiv o absorbție intestinală acceptabilă, statutul de substrat non-P-glicoproteic și o clearance hepatică redusă în comparație cu Bet. Cu toate acestea, toxicitatea prezisă a evidențiat unele riscuri potențiale, precum genotoxicitatea, carcinogenitatea și sensibilizarea cutanată.

Deși obiectivele prezentei cercetări doctorale au fost atinse, oferind informații valoroase privind potențialul anticancerigen al derivaților Bet-1,2,4-triazolici recent sintetizați, sunt necesare studii suplimentare pentru a evalua pe deplin efectele biologice, în special pentru AP5, derivatul principal. Prin urmare, se propun următoarele direcții de cercetare:

• evaluarea activității anticanceroase a AP5 în alte linii celulare de cancer mamar, precum MDA-MB-231 și SK-BR-3;

• validarea biologică a țintelor moleculare prezise *in silico*, în special interacțiunea AP5 cu MMP-2;

• elucidarea mecanismelor moleculare care stau la baza activității anticanceroase a AP5 în cancerul de sân

• evaluarea eficacității anticanceroase și a siguranței AP5 *in ovo* și *in vivo*;

• îmbunătățirea eficacității terapeutice a AP5 prin dezvoltarea unor sisteme adecvate de administrare a medicamentului, precum ciclodextrinele și lipozomii;

• sinteza și evaluarea unor noi analogi ai Bet-1,2,4-triazolului cu potențial terapeutic

6. CONTRIBUȚII ORIGINALE

Principalele contribuții originale ale prezentei cercetări doctorale:

• sinteza și caracterizarea chimică a nouă derivați noi ai Bet-1,2,4-triazolului (Bet-TZ1-4 și AP1-5);

• primul screening *in vitro* privind citotoxicitatea și mecanismul de acțiune al derivaților sintetizați (Bet-TZ1-4 și AP1-5) asupra unui panel de linii celulare tumorale, identificând AP5 ca derivat principal care a prezentat o valoare remarcabilă a IC_{50} de 7,42 µM împotriva liniei celulare MCF-7 (cancer mamar);

• screeningul preliminar in vitro al derivaților sintetizați (Bet-TZ1-4 și AP1-5) împotriva unei linii celulare normale, HaCaT (keratinocite umane);

• identificarea in silico a țintelor potențiale ale seriei AP (AP1–5), MMP-2 fiind prevăzută ca o potențială țintă principală a AP5 pe baza simulărilor de andocare moleculară și de dinamică moleculară;

• evaluarea *in silico* a profilului ADMET al AP5, derivatul principal al seriei.

7. LISTA PUBLICAȚIILOR

Articole în reviste indexate ISI

1. **Prodea, A.**; Mioc, M.; Munteanu, A.; Mioc, A.; Paşcalău, N.A.; Mara, B.-I.; Atyim, E.; Balan-Porcarasu, M.; Racoviceanu, R.; Șoica, C. Novel C3/C28-bis-1,2,4-triazolyl-sulfanylacetate- betulin Derivatives: Synthesis and Evaluation of Anticancer Potential. Int. J. Mol. Sci. 2026, 27, 5960. https://doi.org/10.3390/ijms27135960; Impact Factor (2025): 5.6;

2. **Prodea A.**, Munteanu A., Jorgovan M., Batrina O., Mioc M., Soica I., Trandafirescu C. and Soica C. Triterpenes in breast cancer: a systematic review of preclinical evidence in rodents. Front. Pharmacol. 2025, 16:1623772. doi: 10.3389/fphar.2025.1623772; Impact Factor (2025): 5.4;

3. **Prodea, A.**; Milan, A.; Mioc, M.; Mioc, A.; Oprean, C.; Racoviceanu, R.; Negrea-Ghiulai, R.; Mardale, G.; Avram, Ș.; Bălan Porcărașu, M.; Rotunjanu, S.; Trandafirescu, C.; Șoica, I. and Soica C. Novel Betulin-1,2,4-Triazole Derivatives Promote In Vitro Dose-Dependent Anticancer Cytotoxicity. Processes 2024, 12, 24. https://doi.org/10.3390/pr12010024; Impact Factor (2024): 2.8;

4. **Prodea, A.**; Mioc, A.; Banciu, C.; Trandafirescu, C.; Milan, A.; Racoviceanu, R.; Ghiulai, R.; Mioc, M.; Soica, C. The Role of Cyclodextrins in the Design and Development of Triterpene-Based Therapeutic Agents. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 736, doi:10.3390/ijms23020736; Impact Factor (2022): 5.6;

5. Mioc, M.†; **Prodea, A.†**; Racoviceanu, R.; Mioc, A.; Ghiulai, R.; Milan, A.; Voicu, M.; Mardale, G.; Șoica, C. Recent Advances Regarding the Molecular Mechanisms of Triterpenic Acids: A Review (Part II). Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 8896, doi:10.3390/ijms23168896; †: equal contribution with the first author; Impact Factor (2022): 5.6.

Prezentări la conferințe și webinarii naționale și internaționale

1. **Prodea, A.**; Eşanu, O.; Mioc, M.; Șoica, C. Synthetically Enhanced Betulin-Based Triazoles as Promising Anticancer Agents. International Conference on Interdisciplinary Approaches and Emerging Trends in Pharmaceutical Doctoral Research: Innovation and Integration, Timișoara, 7-9 July 2025, Proceedings 2025, 127, 12. https://doi.org/10.3390/proceedings2025127012

2. **Prodea, A.**; Milan, A.; Mioc, M.; Racoviceanu, R.; Trandafirescu, C.; Mioc, A.; Pârvănescu, R.; Ghiulai; R.; Mardale; G.; Șoica, C.; Chemical heterocyclic derivatization of

pentacyclic triterpenes- a promising strategy for drug development; Workshop New trends in pharmaceutical research; Timișoara 31.03.2023; p. 37-38

3. **Ulici, A.**; Milan, A.; Racoviceanu, R.; Ghiulai, R.; Mioc, M.; Soica, C.; Docking based drug-cyclodextrin complex design, for pentacyclic triterpenes formulation. Scholars International Webinar on Pharmacology and Toxicology THEME: "Novel insights in Therapeutic Approaches in Pharmacology and Toxicology", Webinar 14-15 April 2021