



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Χρήση μοριακής δυναμικής σε συνδυασμό με φασματοσκοπία
NMR για την πρόταση σύνθεσης βιοδραστικών μοριών και
συστημάτων μεταφοράς τους**

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ
Ανδρεάδης Ιωάννης
Χημικός, MSc

ΑΘΗΝΑ

2019

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Χρήση μοριακής δυναμικής σε συνδυασμό με φασματοσκοπία NMR για την πρόταση σύνθεσης βιοδραστικών μορίων και συστημάτων μεταφοράς τους

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ
Ανδρεαδέλης Ιωάννης
A.M.: 001316

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Γεώργιος Κόκοτος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Μάνθος Παπαδόπουλος, Ερευνητής Α΄, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ (Επιβλέπων Καθηγητής)

Γεώργιος Κόκοτος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Μάνθος Παπαδόπουλος, Ερευνητής Α΄, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Γεωργία Βαλσαμή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ

Νικόλαος Θωμαΐδης, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Ανδρέας Τζάκος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας Ιωαννίνων

Γεωργία Μελαγράκη, Επίκουρη Καθηγήτρια, Στρατιωτική Σχολή Ευελπίδων

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 14/10/2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε ο ρόλος της συμπλοκοποίησης φυσικών και φαρμακευτικών μορίων με αποδεδειγμένη ευεργετική δράση στην υγεία με τη 2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD ή 2HP-β-CD). Τα σύμπλοκα όλων των ενώσεων ταυτοποιήθηκαν με χρήση φασματομετρίας ESI QTOF HRMS.

Στο πρώτο τμήμα της διδακτορικής διατριβής, περιγράφονται οι υπολογισμοί μοριακών αλληλεπιδράσεων κατά τη σύμπλεξη μεταξύ των φυσικών προϊόντων καφεϊκού και του ροσμαρινικού οξέος εντός της HP-β-CD χρησιμοποιώντας συνδυασμό φασματοσκοπίας NMR υγρής και στερεής κατάστασης (ssNMR) και μοριακής μοντελοποίησης. Οι μεταβολές των χημικών μετατοπίσεων ανιχνεύθηκαν κατά τη σύμπλεξη στα φάσματα άνθρακα περιστροφής υπό μαγική γωνία και χρήσης διασταυρούμενης πόλωσης ^{13}C CP/MAS καθώς και πρωτονίων στα υψηλής διακριτικής ικανότητας σε διάλυμα φασμάτων ^1H NMR. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών συμπληρούμενα και με αυτά των δύο διαστάσεων 2D NOESY, αποσαφήνισαν τον προσανατολισμό και τις διαμορφώσεις που λαμβάνουν τα φυσικά προϊόντα εντός της υπό μελέτη κυκλοδεξτρίνης. Διεξήχθησαν επίσης πειράματα μοριακής δυναμικής και θερμομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC) για τη διερεύνηση μέσω θερμοδυναμικών παραμέτρων της σταθερότητας των δημιουργούμενων συμπλόκων και του βαθμού υποκατάστασης της κυκλοδεξτρίνης.

Στο δεύτερο τμήμα της διατριβής, μελετήθηκε η συμπλοκοποίηση του AT1 ανταγωνιστή και αντιυπερτασικού φαρμάκου της καντεσαρτάνης (CAN) και του προφαρμάκου του σιλεξετίλης της καντεσαρτάνης (CC) με την HP-β-CD. Τα αποτελέσματα ^{13}C CP/MAS έδειξαν ευρείες κορυφές ειδικά στην αρωματική περιοχή, επιβεβαιώνοντας έτσι τις ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυκλοδεξτρίνης και CAN ή CC. Αυτή η πειραματική παρατήρηση συμφωνεί με τις *in silico* προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής MD και τους υπολογισμούς κβαντομηχανικής. Τα συντιθέμενα σύμπλοκα αξιολογήθηκαν βιολογικά *in vitro* τα οποία κατέδειξαν ισχυρότερη ανταγωνιστική δράση του συμπλόκου με την CAN έναντι αυτού της CC. Το ενδιαφέρον αυτό αποτέλεσμα συμφωνεί με τους θεωρητικούς υπολογισμούς της ελεύθερης ενέργειας, οι οποίοι προβλέπουν την αποτελεσματικότερη δέσμευση με τη CC σε αντίθεση με αυτήν της CAN. Επομένως η CC δεν αποδεσμεύεται εύκολα από την HP-β-CD και δεν μπορεί να αποτελέσει νέα φαρμακοτεχνική μορφή. Το αντίθετο συμβαίνει με το φάρμακο CAN το οποίο μπορεί να αποτελέσει μια νέα βελτιωμένη φαρμακοτεχνική μορφή κατά της υπέρτασης.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Μελέτη συμπλόκων κυκλοδεξτρίνης μέσω βιοφυσικών τεχνικών και θεωρητικών υπολογισμών.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Καφεϊκό οξύ, ροσμαρινικό οξύ, καντεσαρτάνη, σιλεξετίλη της καντεσαρτάνης, μοριακή δυναμική.

ABSTRACT

In this thesis, the role of complexing natural and pharmaceutical molecules with proven beneficial health properties with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) was studied.

In the first part of the thesis, the molecular interactions between caffeic and rosmarinic acid in hydroxypropyl- β -cyclodextrin were studied using a combination of NMR spectroscopy and molecular modeling. Changes in the chemical shifts of carbon (^{13}C CP/MAS) and hydrogen spectroscopy as well as intermolecular within the complex NOEs have clarified the orientation and conformations of the natural products into the cyclodextrin. Molecular dynamics and Isothermal Calorimetry (ITC) experiments were also conducted to investigate the stability and degree of substitution of the cyclodextrin.

In the second part of the thesis, complexes of candesartan and candesartan cilexetil with HP- β -CD were characterized using ESI QTQF HRMS and solid state NMR and in particular CP/MAS spectroscopy. The ^{13}C CP/MAS results showed broad peaks especially in the aromatic region, thus confirming the strong interactions between cyclodextrin and drugs. This experimental evidence was in accordance with MD simulations and quantum mechanical calculations. The synthesized and characterized complexes were evaluated biologically *in vitro*. It was shown that as a result of CAN's complexation, CAN exerts higher antagonistic activity than CC. This intriguing result agrees with binding free energy calculations, which predicted efficient binding with CC while CAN binding was not favored. Thus, CC cannot be released easily from HP- β -CD and as a result is not suggested as a new pharmaceutical formulation. The opposite holds truth for CAN complex which could be used as a novel antihypertensive pharmaceutical formulation.

SUBJECT AREA: Study of cyclodextrin complexes with biophysical and computational methods.

KEYWORDS: Caffeic acid, rosmarinic acid, candesartan, candesartan cilexetil, molecular dynamics.

Στην οικογένειά μου,

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

- Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς τον επιβλέπων καθηγητή κ. Θωμά Μαυρομούστακο, για την υποστήριξη του και την πολύτιμη βοήθειά του σ' επιστημονικά θέματα κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής.
- Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον ερευνητή Α΄ του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών κ. Μάνθο Παπαδόπουλο για την υποστήριξη που μου παρείχε στην υπολογιστική χημεία.
- Είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων στον καθηγητή κ. Γεώργιο Κόκοτο για την ουσιαστική βοήθεια που παρείχε καθώς και για τις εποικοδομητικές διορθώσεις.
- Είμαι ευγνώμων στον αναπληρωτή καθηγητή κ. Ανδρέα Τζάκο για την εποικοδομητική συνεργασία καθώς και τις διορθώσεις στη διδακτορική αυτή εργασία. Τον ευχαριστώ επίσης γιατί τα πειράματα ITC διεξήχθησαν στο εργαστήριο του με τη βοήθεια της μεταπτυχιακής φοιτήτριας Μαρίας Β. Χατζηαθανασιάδου.
- Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Γεώργιο Λιαπάκη για τις χρήσιμες συμβουλές κατά την περίοδο που εκπονούσα τα μεταπτυχιακό έως τώρα καθώς και για την αποτίμηση των *in vitro* πειραμάτων.
- Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Ν. Θωμαΐδη για τα πειράματα MS που διεξήχθησαν στο εργαστήριο του.
- Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Γεωργία Βαλσαμή γιατί οι συμπλοκοποιήσεις των φυσικών προϊόντων και των αντιυπερτασικών μορίων διεξήχθησαν στο εργαστήριο της υπό την επίβλεψή της. Θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω την Δρ Χριστοδούλου Ειρήνη για τη βοήθεια στα παρασκευάσματα των συμπλόκων.
- Θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια κ. Γεωργία Μελαγράκη για τις εύστοχες διορθώσεις και παρατηρήσεις στη διδακτορική μου διατριβή.
- Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους Δρ Ταχσίν Κελίτση, Δρ Γεώργιο Λεώνη, για την βοήθειά τους σε θέματα που αφορούσαν υπολογιστική χημεία, καθώς και τον Δρ Δημήτρη Ντουντανιώτη σε θέματα που αφορούσαν NMR.
- Τέλος, στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 50.000 ώρες GPU μέσω του προγράμματος Cy-Tera (NEA ΥΠΟΔΟΜΗ/ΣΤΡΑΤΗ/0308/31), το οποίο συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης και τη

Δημοκρατία της Κύπρου μέσω του Ιδρύματος Προώθησης Έρευνας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Θέκλα Λοΐζου για τη βοήθεια της στην ορθή χρήση των υπολογιστικών συστοιχιών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 Γενικά για τις κυκλοδεξτρίνες | 21 |
| 1.1 | Διάρθρωση της διδακτορικής διατριβής | 21 |
| 1.2 | Εισαγωγή | 22 |
| 1.3 | Ιστορική αναδρομή | 26 |
| 1.3.1 | Τα πρώτα βήματα: 1891-1930 | 26 |
| 1.3.2 | Συστηματικές μελέτες των κυκλοδεξτρινών και των συμπλόκων εγκλεισμού τους: 1930-1970 | 27 |
| 1.3.3 | Σύγχρονη εποχή: 1970-σήμερα | 29 |
| 1.4 | Οι κυκλοδεξτρίνες ως συστήματα μεταφοράς φαρμακευτικών μορίων στους μοριακούς τους στόχους | 30 |
| 1.4.1 | Φυσικοχημικές ιδιότητες που ευνοούν τη συμπλοκοποίηση | 30 |
| 1.4.2 | Η χρήση των κυκλοδεξτρινών στις φαρμακοτεχνικές μορφές (drug formulations) | 32 |
| 1.4.3 | Παραδείγματα φαρμακοτεχνικών μορφών κυκλοδεξτρινών | 32 |
| 1.5 | Η διάθεση των φαρμάκων μέσω κυκλοδεξτρινών σε διάφορα συστήματα χορήγησης | 34 |
| 1.5.1 | Ελεγχόμενη χορήγηση βιοδραστικών ενώσεων από το στόμα | 38 |
| 1.5.2 | Συστήματα άμεσης απελευθέρωσης (immediate release systems) | 40 |
| 1.5.3 | Συστήματα καθυστερημένης απελευθέρωσης (delayed release) | 43 |
| 1.5.4 | Συστήματα παρατεταμένης απελευθέρωσης (prolonged release) | 45 |
| 1.5.5 | Συστήματα τροποποιημένης αποδέσμευσης | 47 |
| 1.6 | 2-Υδροξυπρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD) | 52 |
| 1.7 | Τεχνικές ανάλυσης των συμπλόκων φαρμάκου κυκλοδεξτρίνης | 56 |
| 1.7.1 | Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC) | 56 |
| 1.7.2 | Φασματοσκοπία NMR υγρής κατάστασης | 58 |
| 1.7.3 | Φασματοσκοπία NMR στερεής κατάστασης (solid state NMR) | 59 |
| 1.7.3.1 | Ανισοτροπία χημικής μετατόπισης | 60 |
| 1.7.3.2 | Αλληλεπίδραση διπόλου-διπόλου | 61 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1.7.3.3 | Συζεύξεις spin-spin και τετραπόλων | 62 |
| 1.7.3.4 | Διπολική αποσύζευξη | 63 |
| 1.7.3.5 | Περιστροφή του δείγματος υπό μαγική γωνία (MAS-Magic Angle Spinning) .. | 63 |
| 1.7.3.6 | Μεταφορά πόλωσης (CP-Cross Polarization)..... | 64 |
| 1.7.4 | Μοριακή δυναμική | 64 |
| 1.7.5 | Μέθοδος MM-PBSA | 66 |
| 1.7.6 | Φθορισμομετρία | 68 |
| 1.7.7 | Φασματομετρία μάζας | 69 |
| 1.8 | Κερκετίνη | 72 |
| 1.9 | Καφεϊκό και ροσμαρινικό οξύ | 74 |
| 1.10 | Καντεσαρτάνη και η σιλεξετίλη της | 74 |
| 2 | ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 Σκοπός της διδακτορικής διατριβής..... | 78 |
| 3 | ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Υλικά και μέθοδοι | 79 |
| 3.1 | Για το καφεϊκό και ροσμαρινικό οξύ: | 79 |
| 3.1.1 | Συμπλοκοποίηση | 79 |
| 3.1.2 | Πειράματα NMR | 79 |
| 3.1.3 | Μοριακή μοντελοποίηση | 80 |
| 3.1.4 | Μοριακή δυναμική | 80 |
| 3.1.5 | Σύγκριση μοριακής δυναμικής με NOE | 81 |
| 3.1.6 | Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης | 82 |
| 3.2 | Για την καντεσαρτάνη και τη σιλεξετίλη της καντεσαρτάνης: | 83 |
| 3.2.1 | Σύνθεση της Καντεσαρτάνης:..... | 83 |
| 3.2.2 | Παρασκευή των λυοφιλοποιημένων προϊόντων CAN-HP-β-CD και CC-HP-β-CD: 83 | |
| 3.2.3 | Μοριακή μοντελοποίηση. | 84 |
| 3.2.4 | Μεθοδολογία Φασματομετρίας μάζας | 85 |
| 3.2.5 | Προετοιμασία μητρικού διαλύματος και διαλύματος εργασίας | 85 |
| 3.2.6 | Δοκιμές σταθερότητας πλάσματος | 86 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.2.7 | Καλλιέργεια και συλλογή κυττάρων, προετοιμασία της μεμβράνης | 86 |
| 3.2.8 | Μελέτες δέσμησης | 87 |
| 4 | ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 Σύμπλοκα καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέως με την HP-β-CD | 89 |
| 4.1 | Εισαγωγή..... | 89 |
| 4.2 | Στόχος του κεφαλαίου..... | 92 |
| 4.3 | Πειραματικό μέρος | 93 |
| 4.3.1 | Φασματομετρία μάζας..... | 93 |
| 4.3.2 | Φάσματα ¹³ C CP-MAS NMR..... | 95 |
| 4.3.3 | Φάσματα υψηλής διακριτικής ικανότητας σε υγρή κατάσταση | 99 |
| 4.3.4 | ITC και εξαγωγή θερμοδυναμικών παραμέτρων | 109 |
| 4.3.5 | Πειράματα μοριακής δυναμικής..... | 112 |
| 4.3.6 | Σύγκριση μοριακής δυναμικής με NOE | 117 |
| 4.4 | Συμπεράσματα | 119 |
| 5 | ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 Σύμπλοκα της καντεσαρτάνης και της σιλεξετίλης της με HP-β-CD | 121 |
| 5.1 | Εισαγωγή..... | 121 |
| 5.2 | Στόχος του κεφαλαίου..... | 121 |
| 5.3 | Πειραματικό μέρος | 122 |
| 5.4 | ESI-MS | 122 |
| 5.5 | ¹³ C CP/MAS αποτελέσματα | 129 |
| 5.6 | Φασματοσκοπικές μελέτες φθορισμού..... | 133 |
| 5.7 | Μοριακή δυναμική συμπλόκου CC-HP-β-CD: | 135 |
| 5.8 | Μοριακή δυναμική συμπλόκου CAN-HP-β-CD: | 138 |
| 5.9 | Δοκιμασία σταθερότητας πλάσματος..... | 141 |
| 5.10 | Πρόσδεση των αναλόγων AngII με τον ανθρώπινο υποδοχέα AT1. | 143 |
| 5.11 | Συμπεράσματα | 145 |
| 6 | Γενικά συμπεράσματα | 147 |

| | | |
|---|--|-----|
| 7 | ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ..... | 148 |
| 8 | Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια | 150 |
| 9 | ΑΝΑΦΟΡΕΣ | 152 |

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

| | |
|---|----|
| Σχήμα 1 Δομή της διδακτορικής διατριβης..... | 21 |
| Σχήμα 2 Δομικές μονάδες κυκλοδεξτρινών..... | 23 |
| Σχήμα 3 Φάρμακο κατάλληλου μεγέθους μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκο με τις κυκλοδεξτρίνες. Το σύμπλοκο αυτό βρίσκεται σε μια δυναμική ισορροπία με την ελεύθερη μορφή του φαρμάκου. | 31 |
| Σχήμα 4 Η β-CD περιέχει 21 ομάδες υδροξυλίου, 7 από τις οποίες είναι πρωτοταγείς και οι υπόλοιπες 14 δευτεροταγείς. Οι άνθρακες C3 και C2 βρίσκονται εντός της υδρόφοβης κοιλότητας ενώ οι άνθρακες C4,C5 και C6 βρίσκονται εκτός [71]. | 36 |
| Σχήμα 5 Τυπικά προφίλ απελευθέρωσης φαρμάκου μετά από χορήγηση από το στόμα: (Α) Άμεση απελευθέρωση, (Β) Παρατεταμένη απελευθέρωση, (Γ) Τροποποιημένη απελευθέρωση, (Δ) Καθυστερημένη απελευθέρωση [85]. | 38 |
| Σχήμα 6. Συνολική διαδικασία της απορρόφησης του φαρμάκου από ένα σύμπλοκο εγκλεισμού με ακόλουθη διάλυση και διάσπαση στον γαστρεντερικό σωλήνα [85]. | 41 |
| Σχήμα 7 Διαλυτότητα της CME-β-CD, ως συνάρτηση του pH σε υδατικό διάλυμα στους 25 °C [83]. | 43 |
| Σχήμα 8 Επίπεδα πλάσματος της διλτιαζέμης μετά την από του στόματος χορήγηση δισκίων που περιέχουν CME-β-CD σύμπλοκο (ισοδύναμο με διλτιαζέμη σε 30 mg) σε ελεγχόμενη γαστρική οξύτητα σκύλων ○, υψηλή γαστρική οξύτητα σκύλων, • , χαμηλή γαστρική οξύτητα σκύλων. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο ± ένα τυπικό σφάλμα των τεσσάρων σκύλων. *, ρ <0.05 [104]. | 44 |
| Σχήμα 9 Επίπεδα μολσιδομίνης στο πλάσμα μετά την από του στόματος χορήγηση καψουλών που περιέχουν μολσιδομίνη ή υπερακυλιωμένα σύμπλοκα β-CD (ισοδύναμο με 10 mg μολσιδομίνης) σε σκύλους. •, το φάρμακο μόνο του, △, σύμπλοκο TA-β-CD, ■, σύμπλοκο TB-β-CD, ◇, σύμπλοκο TH-β-CD. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ± τυπικό σφάλμα τριών-έξι σκύλων. *, ρ <0.05 έναντι του φαρμάκου που χορηγείται σε μη συμπλοκοποιημένη μορφή [111]. | 47 |
| Σχήμα 10 Προφίλ απελευθέρωσης της νιφετιδίνης (5 mg) από το απλό δισκίο (F0) και από επτά δισκία διπλής στρώσης (F1-F7) σε νερό στους 37 °C [114]. Η αναλογία των τμημάτων ταχείας-βραδείας αποδέσμευσης ακολουθεί την εξής σειρά F0 3:0, F1 3:1, F2 3:2, F3 3:3, F4 2:3, F5 1:3 και F6 0:3 [114]. | 48 |

| | |
|---|----|
| Σχήμα 11 Επίπεδα της νιφεδιπίνης μετά από του στόματος χορήγηση των δισκίων (20 mg, όπως νιφεδιπίνη) σε σκύλους. ○, δισκίο διπλής στρώσης (F 2) ▲, δισκίο διπλής στρώσης (F 3) □, Adalat L-20. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ± τυπικό σφάλμα των τεσσάρων σκύλων [115]. | 49 |
| Σχήμα 12 Προφίλ απελευθέρωσης του φαρμάκου μετά από του στόματος χορήγηση [120]. | 51 |
| Σχήμα 13 Παραδείγματα δομής της υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης (HP-β-CD) ανάλογα με τον βαθμό υποκατάστασης της. | 52 |
| Σχήμα 14 α. Κάθετη διατομή συσκευής ITC, β. Εσωτερική διάταξη της συσκευής [147]. | 57 |
| Σχήμα 15 Μεθοδολογία εξαγωγής βασικών θερμοδυναμικών παραμέτρων στα σύμπλοκα των βιοδραστικών ενώσεων με HP-β-CD με τη χρήση της ITC. | 58 |
| Σχήμα 16 Όταν το δείγμα περιστρέφεται υπό γωνία θ , σε σχέση με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, ίση με $\theta = 54,44'$ ($54,74^\circ$), τότε εξαλείφεται η ανισοτροπία χημικής μετατόπισης. Η μαγική γωνία είναι η γωνία που σχηματίζεται μεταξύ του z άξονα και της διαγωνίου του υποθετικού κύβου του παραπάνω σχήματος. | 64 |
| Σχήμα 17 Υπολογισμός ενέργειας μέσω της μεθόδου MM-PBSA. | 67 |
| Σχήμα 18 Παράδειγμα υπολογισμού σταθεράς πρόσδεσης μιας αντίδρασης μέσω της φθορισμομετρίας. Α) Η σύμπλεξη της ιρμπεσαρτάνης με την HP-β-CD αυξάνει τον φθορισμό της. Β) Η σταθερά σύμπλεξης υπολογίζεται μέσω της εξίσωσης Benesi-Hildebrand στα $503 \pm 90 \text{ M}^{-1}$. | 69 |
| Σχήμα 19 Το πεδίο εφαρμογής των τεχνικών ιοντισμού σε ατμοσφαιρική πίεση: στους δύο άξονες αναγράφονται η πολικότητα και το μοριακό βάρος των αναλυόμενων ενώσεων [168]. <i>APCI=Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (Χημικός ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση)</i> , <i>APPI=Atmospheric Pressure Photo Ionisation (Φωτοϊοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση)</i> . | 72 |
| Σχήμα 20 Μεθοδολογία σύμπλεξης φαρμάκων στις κυκλοδεξτρίνες. (Α) Δημιουργία συμπλόκου 1:1, (Β) Δημιουργία συμπλόκου 1:2, (Γ) Παράδειγμα δημιουργίας συμπλόκου 1:1 με κερκετίνη, (Δ) Παράδειγμα δημιουργίας συμπλόκου 1:2 με την κουρκουμίνη καθώς ο δύσκαμπτος και ευθύγραμμος σκελετός της το ευνοεί. | 73 |
| Σχήμα 21 Δομή της Α) Σιλεξετίλης της καντεσαρτάνης Β) Καντεσαρτάνης, Γ) Υδροξυπρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης. | 77 |
| Σχήμα 22 Υδρόλυση της CC. | 83 |

| | | |
|----------|--|-----|
| Σχήμα 23 | Δομική μονάδα της HP-β-CD αποτελούμενης από επτά μονάδες β-D-γλυκοπυρανόζης (αριστερά). Δομές του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος (δεξιά)..... | 89 |
| Σχήμα 24 | In silico υπολογισθείσες φυσικοχημικές ιδιότητες, λιποφιλίας,φαρμακο-ομοιότητας, φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές του καφεϊκού οξέος σύμφωνα με τη δομή του [212]. | 90 |
| Σχήμα 25 | In silico υπολογισθείσες φυσικοχημικές ιδιότητες, λιποφιλίας,φαρμακο-ομοιότητας, φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές του ροσμαρινικού οξέος σύμφωνα με τη δομή του [212]..... | 91 |
| Σχήμα 26 | Διάγραμμα εργασιών για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων κυκλοδεξτρίνης με τα φυσικά προϊόντα. Η σύνθεση των συμπλόκων παρουσιάζεται στο κεφάλαιο 3 (Υλικά και μέθοδοι)..... | 92 |
| Σχήμα 27 | Μεγεθύνσεις περιοχών του φάσματος ESI-MS σε λειτουργία αρνητικού ιόντος για το σύμπλοκο CA-HP-β-CD όπου απεικονίζονται οι περιοχές κορυφής των (A) HP-β-CD και (B) CA-HP-β-CD..... | 94 |
| Σχήμα 28 | Μεγεθύνσεις περιοχών του φάσματος ESI-MS σε λειτουργία αρνητικού ιόντος για το σύμπλοκο RA-HP-β-CD όπου απεικονίζονται οι κορυφές των (A) HP-β-CD και (B) RA-HP-β-CD..... | 94 |
| Σχήμα 29 | Φάσματα ¹³ C-CP/MAS του (A) HP-β-CD, (B) καφεϊκού οξέος συμπλοκοποιημένου με την HP-β-CD (Γ) της αρωματικής περιοχής. | 96 |
| Σχήμα 30 | Φάσματα ¹³ C-NMR του (A) HP-β-CD, (B) ροσμαρινικού οξέος (Γ) του συμπλόκου ροσμαρινικού οξέος με HP-β-CD, (Δ) και της μεγέθυνσης της αρωματικής περιοχής. Τόσο η ελεύθερη όσο και η συμπλοκοποιημένη κυκλοδεξτρίνη μεγεθύνθηκαν 10 φορές. Η αρωματική περιοχή (D) του συμπλόκου μεγεθύνθηκε 10 φορές..... | 97 |
| Σχήμα 31 | Υπέρθωση φασμάτων <i>Μπλε</i> HP-β-CD <i>Κόκκινο</i> RA και <i>Πράσινο</i> Σύμπλοκο RA με HP-β-CD. Παρατηρείται ότι το φάσμα του συμπλόκου μετατοπίζεται σε υψηλότερα προασπισμένες περιοχές όπως αναμενόταν. | 99 |
| Σχήμα 32 | Φάσμα 1H NMR της HP-β-CD σε D ₂ O σε θερμοκρασία δωματίου..... | 100 |
| Σχήμα 33 | Φάσμα 2D NMR COSY της HP-β-CD σε D ₂ O σε θερμοκρασία δωματίου. Στο φάσμα είναι εμφανείς οι συσχετισμοί μέσω δεσμού των CH3-H8, H8-H7, H1-H2 και H2-H3..... | 101 |
| Σχήμα 34 | Φάσμα 2D NMR ROESY της HP-β-CD σε D ₂ O σε θερμοκρασία δωματίου..... | 102 |
| Σχήμα 35 | Φάσμα 2D NMR HSQC της HP-β-CD σε D ₂ O σε θερμοκρασία δωματίου..... | 103 |
| Σχήμα 36 | Φάσμα 2D NMR HMBC της HP-β-CD σε D ₂ O σε θερμοκρασία δωματίου..... | 104 |

| | |
|---|-----|
| Σχήμα 37 Φάσμα ^1H NMR της HP- β -CD σε D_2O στις θερμοκρασίες (A) 30 °C (B) 35 °C (Γ) 40 °C (Δ) 45 °C και (E) 50 °C..... | 105 |
| Σχήμα 38 Το φάσμα ^1H -NMR σε υγρή κατάσταση του καφεϊκού οξέος (A) και του συμπλόκου του με HP- β -CD (B) [41]. | 106 |
| Σχήμα 39 Φάσμα ^1H -NMR του RA υγρής κατάστασης (A) και του συμπλόκου του με HP- β -CD (B). Η κορυφή υψηλής έντασης στα περίπου 1 ppm αντιστοιχεί στις μεθυλομάδες των υδροξυλο-προπυλικών ομάδων. Οι χημικές μετατοπίσεις του HP- β -CD είναι σύμφωνες με εκείνες που αναφέρονται σε προηγούμενες μελέτες [224]. | 107 |
| Σχήμα 40 2D ^1H - ^1H NOESY NMR του συμπλόκου του CA-HP- β -CD σε D_2O χρησιμοποιώντας χρόνο μίξης (τ_m) 300 ms. Οι συσχετίσεις NOE του CA με την HP- β -CD υποδεικνύονται με περιφερειακούς πράσινους δακτυλίους επί των αριθμών. Η ένταση του πράσινου χρώματος δείχνει την ένταση του σήματος. Οι συσχετισμοί στα σχετικά φάσματα κάτω από τη διαγώνιο λείπουν λόγω της επικάλυψης με τη χημική δομή της ένωσης. | 108 |
| Σχήμα 41 2D ^1H - ^1H NOESY NMR του συμπλόκου του RA-HP- β -CD χρησιμοποιώντας χρόνο μίξης 300 ms. Τα NOE που αναπτύσσονται μεταξύ του RA και της HP- β -CD υποδεικνύονται με περιφερειακούς πράσινους δακτυλίους επί των αριθμών. Η ένταση του πράσινου χρώματος δείχνει την ένταση του σήματος. Οι συσχετισμοί στα σχετικά φάσματα κάτω από τη διαγώνιο λείπουν λόγω της επικάλυψης με τη χημική δομή της ένωσης. | 109 |
| Σχήμα 42 ITC διαγράμματα αλληλεπίδρασης HP- β -CD (10 mM) με (A) CA και (B) RA..... | 111 |
| Σχήμα 43 Ρίζα της μέσης τετραγωνικής απόκλισης (RMSD) του γραφήματος HP- β -CD (κόκκινο), φυσικό προϊόν (μπλε). (A) Χαμηλό DS σύμπλοκο με CA, (B) Υψηλό DS σύμπλοκο με CA, (C) Χαμηλό DS σύμπλοκο με RA, (D) Υψηλό DS σύμπλοκο με RA. | 115 |
| Σχήμα 44 Στιγμιότυπο προσομοίωσης μοριακής δυναμικής, (A) χαμηλού DS CA συμπλοκοποιημένου με 2-HP- β -CD, (B) υψηλού DS CA συμπλοκοποιημένου με 2-HP- β -CD, (Γ) χαμηλού DS RA συμπλοκοποιημένου με 2-HP- β -CD, (Δ) υψηλού DS RA συμπλοκοποιημένου με 2-HP- β -CD. | 116 |
| Σχήμα 45 Διάγραμμα εργασιών για τη μελέτη των συμπλόκων CAN/CC με τη HP- β -CD. Η δημιουργία συμπλόκου μελετήθηκε στο κεφάλαιο 3 (Υλικά και μέθοδοι). | 122 |
| Σχήμα 46 Φάσμα μάζας του διαλύματος HP- β -CD, στην κλίμακα από 1200 έως 1700 Da, που περιλαμβάνει α) τα απλά φορτισμένα ιόντα κυκλοδεξτρινών υποκατεστημένα με 2 έως 9 ομάδες HP και (β) Φάσμα μάζας του ίδιου διαλύματος, στην κλίμακα από 600 έως 850 Da, που | |

| | |
|--|-----|
| περιλαμβάνει τα διπλά φορτισμένα ιόντα κυκλοδεξτρινών υποκατεστημένα από 2 έως 9 ομάδες HP..... | 123 |
| Σχήμα 47 (A1,B1) Πλήρης σάρωση MS των CAN και CC αντίστοιχα. (A2), (B2) Σύγκριση μεταξύ του θεωρητικού και πειραματικού φάσματος μάζας του ψευδομοριακού ιόντος CAN και CC αντίστοιχα. | 125 |
| Σχήμα 48 (α) Πλήρες φάσμα MS σάρωσης του CAN-HP-β-CD στην περιοχή μαζών 1800-2100 Da. Τα ιόντα μέσα στα πράσινα ορθογώνια, αντιστοιχούν σε σύμπλοκα απλής φόρτισης CAN-HP-β-CD με διαφορετικό βαθμό υποκατάστασης β-CD από την ομάδα HP. (β) Επικάλυψη του θεωρητικού και του πειραματικού φάσματος μάζας ενός από τα σύμπλοκα (το 6-υποκατεστημένο) του CAN-HP-β-CD, ως παράδειγμα. (γ) Πλήρης σάρωση φάσματος MS του CAN-HP-β-CD στην περιοχή μάζας 860-1060 Da. Τα ιόντα μέσα στα πράσινα ορθογώνια, αντιστοιχούν σε διπλά φορτισμένα σύμπλοκα της CAN-HP-β-CD με διαφορετικό βαθμό υποκατάστασης της β-CD από ομάδα HP. | 127 |
| Σχήμα 49 (α) Πλήρης σάρωσης φάσμα MS του CC-HP-β-CD στην περιοχή μαζών 1960-2160 Da. Τα ιόντα μέσα στα πράσινα ορθογώνια, αντιστοιχούν σε συμπλέγματα CC-HP-β-CD με διαφορετικό φορτίο και με διαφορετικό βαθμό υποκατάστασης β-CD από την ομάδα HP. (β) Πλήρης σάρωση MS φάσμα CC-HP-β-CD στην περιοχή μάζας 890-1030 Da. Τα ιόντα μέσα στα πράσινα ορθογώνια, αντιστοιχούν σε συμπλέγματα διπλής φόρτισης CC-HP-β-CD με διαφορετικό βαθμό υποκατάστασης β-CD από την ομάδα HP. (γ) Επικάλυψη του θεωρητικού και του πειραματικού φάσματος μάζας ενός από τα σύμπλοκα (το 2-υποκατεστημένο) του CC-HP-β-CD, ως παράδειγμα..... | 128 |
| Σχήμα 50 Στο σχήμα εμφανίζονται διάφορες περιοχές φάσματος (A) ¹³ C CP/MAS CAN, (B) HP-β-CD, (Γ) μίγμα CAN/HP-β-CD και (Δ) σύμπλοκο CAN/HP-β-CD (αναλογία 1:1)..... | 129 |
| Σχήμα 51 Αλληλεπιδράσεις της CC με την HP-β-CD. Στο σχήμα δείχνονται οι διάφορες περιοχές φάσματος ¹³ C CP/MAS (A) CC, (B) HP-β-CD, (Γ) μίγμα CC/HP-β-CD και (Δ) σύμπλοκο CC /HP-β-CD (αναλογία 1:1). Οι ταυτοποιήσεις έγιναν σύμφωνα με την βιβλιογραφία [232]..... | 132 |
| Σχήμα 52 A, B) Φάσματα φθορισμού της CC μετά την τιτλοδότηση με διάφορες συγκεντρώσεις HP-β-CD (0, 0,15, 0.35, 0.5, 0.65, 0.85, 1, 2, 3, 4, 5, 6 mM) και pH 6.8 και 4.1, αντίστοιχα. C, D) Φάσματα φθορισμού του CAN μετά την τιτλοδότηση με διάφορες συγκεντρώσεις HP-β-CD. . | 134 |
| Σχήμα 53 A) Φθορισμομετρικές εντάσεις της CC στα 430 nm με την προσθήκη διάφορων συγκεντρώσεων HP-β-CD B) Διπλό αντίστροφο διάγραμμα (double reciprocal plot) του ίδιου πειράματος. | 135 |

| | |
|---|-----|
| Σχήμα 54 RMSD των ατόμων σε σχέση με τον χρόνο για CC και κυκλοδεξτρίνη στην προσέγγιση A (A) και προσέγγιση B (B). Ρίζες μέσης τετραγωνικής διακύμανσης (RMSF) βαρέων ατόμων της CC (C). Στιγμιότυπα του συμπλόκου CC-HP-β-CD μετά από 400 ns για την προσέγγιση A (D) και προσέγγιση B (E)..... | 137 |
| Σχήμα 55 Η μέση τετραγωνική ρίζα απόκλισης (RMSD) όλων των ατόμων σε συνάρτηση με τον χρόνο για την καντεσαρτάνη και κυκλοδεξτρίνη στον προσανατολισμό A (A) και B (B). Ρίζες μέσης τετραγωνικής διακύμανσης (RMSF) βαρέων ατόμων CAN (Γ). Στιγμιότυπο του συμπλόκου CAN-HP-β-CD μετά από 400 ns στον προσανατολισμό A (Δ) και προσανατολισμό B (E)..... | 139 |
| Σχήμα 56 Συγκέντρωση CC και CAN μετά από επώαση σε ανθρώπινο πλάσμα στους 37° C του A) συμπλόκου CC-HP-β-CD και B) CC..... | 143 |
| Σχήμα 57 Ανάλογο AngII και σύμπλοκα ανταγωνιστών με HP-β-CD προς δέσμευση στον ανθρώπινο υποδοχέα AT1. Η αναστολή ειδικής δέσμευσης [¹²⁵ I-Sar1-Ile8] AngII έγινε με 1000 nM ανταγωνιστών και τα σύμπλοκά τους με HP-β-CD ή HP-β-CD, όπως περιγράφεται στο "Υλικά και Μέθοδοι", σε μεμβράνες από κύτταρα HEK 293 που εκφράζουν σταθερά τον ανθρώπινο υποδοχέα AT1. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν την % αναστολή της ραδιοεπισημασμένης Ang II ειδικής δέσμευσης από τους ανταγωνιστές. | 144 |
| Σχήμα 58 Ισόθερμες καμπύλες δέσμευσης των ανταγωνιστών AngII ή των συμπλοκών τους με τον ανθρώπινο υποδοχέα AT1. Διεξήχθη ανταγωνισμός της ειδικής δέσμευσης [¹²⁵ I-Sar1-Ile8] AngII με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ανταγωνιστών AngII, όπως περιγράφεται στο "Υλικά και Μέθοδοι", σε μεμβράνες από κύτταρα HEK 293 που εκφράζουν σταθερά τον ανθρώπινο υποδοχέα AT1. Τα δεδομένα προκύπτουν από αντιπροσωπευτικό πείραμα που διεξήχθη 2 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Τα δεδομένα ήταν κατάλληλα για να χρησιμοποιηθεί μοντέλο ανταγωνισμού μίας θέσης με μη γραμμική παλινδρόμηση. | 145 |

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

| | |
|--|-----|
| Πίνακας 1 Εγκριθέντα για κυκλοφορία στην αγορά σύμπλοκα φαρμάκων-κυκλοδεξτρινών [14]. | 24 |
| Πίνακας 2 Σύστημα βιοφαρμακευτικής ταξινόμησης, στο οποίο τα φάρμακα χωρίζονται σε 4 τύπους ανάλογα με τα χαρακτηριστικά διαλυτότητας και διαπερατότητας τους. Ως διαλυτότητα φαρμάκου ορίζεται η αναλογία δόσης/διαλυτότητα και ένα φάρμακο χαρακτηρίζεται ως διαλυτό, όταν η υψηλότερη δόση που ορίζεται για ανθρώπινη χρήση θα διαλύεται σε 250 mL ύδατος... 26 | 26 |
| Πίνακας 3 Χρήσιμα παράγωγα της β-CD στη φαρμακευτική [72]. | 36 |
| Πίνακας 4 Τροποποίηση του τύπου ελευθέρωσης του φαρμάκου ή/και του χρόνου από τις CDs [85]..... | 39 |
| Πίνακας 5 Ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες της ακυλιωμένης β-CD α) Σε χλωροφόρμιο στους 25 °C, β) σε 80% (v/v) αιθανόλη-νερό στους 25 °C, γ) ελαιώδης ουσία, δ) στο νερό, ε) δεν μπορεί να προσδιοριστεί λόγω της χαμηλής διαλυτότητας [108]. | 45 |
| Πίνακας 6 ¹³ C-NMR χημικές μετατοπίσεις του CA στην βιβλιογραφία και όπως μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή (¹³ C-CP-MAS σε 150MHz). Σύγκριση με το συμπλοκοποιημένο σε HP-β-CD. | 95 |
| Πίνακας 7 ¹³ C-NMR χημικές μετατοπίσεις του ροσμαρινικού οξέος στη βιβλιογραφία. Σύγκριση με το συμπλοκοποιημένο με HP-β-CD..... | 98 |
| Πίνακας 8 ¹ H-NMR χημικές μετατοπίσεις του CA όπως αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Σύγκριση με το συμπλοκοποιημένο με HP-β-CD..... | 106 |
| Πίνακας 9 ¹ H χημικές μετατοπίσεις του RA στη βιβλιογραφία. Σύγκριση με το συμπλοκοποιημένο με HP-β-CD..... | 107 |
| Πίνακας 10 Σύγκριση υπολογιζόμενων σταθερών δέσμησης των CA/RA-HP-β-CD συμπλόκων μέσω ITC με τις αντίστοιχες της βιβλιογραφίας..... | 110 |
| Πίνακας 11 Θερμοδυναμικές παράμετροι της αλληλεπίδρασης HP-β-CD με καφεϊκό και ροσμαρινικό οξύ..... | 111 |
| Πίνακας 12 Υπολογισμένες μεταβολές της ενθαλπίας του συστήματος CA (RA)-HP-β-CD που λαμβάνεται από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής ενός μικροδευτερολέπτου..... | 112 |
| Πίνακας 13 Ανάλυση της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας δέσμησης για το σύμπλεγμα CA-HP-β-CD όπως υπολογίστηκε με τη μέθοδο MM-PBSA. | 113 |

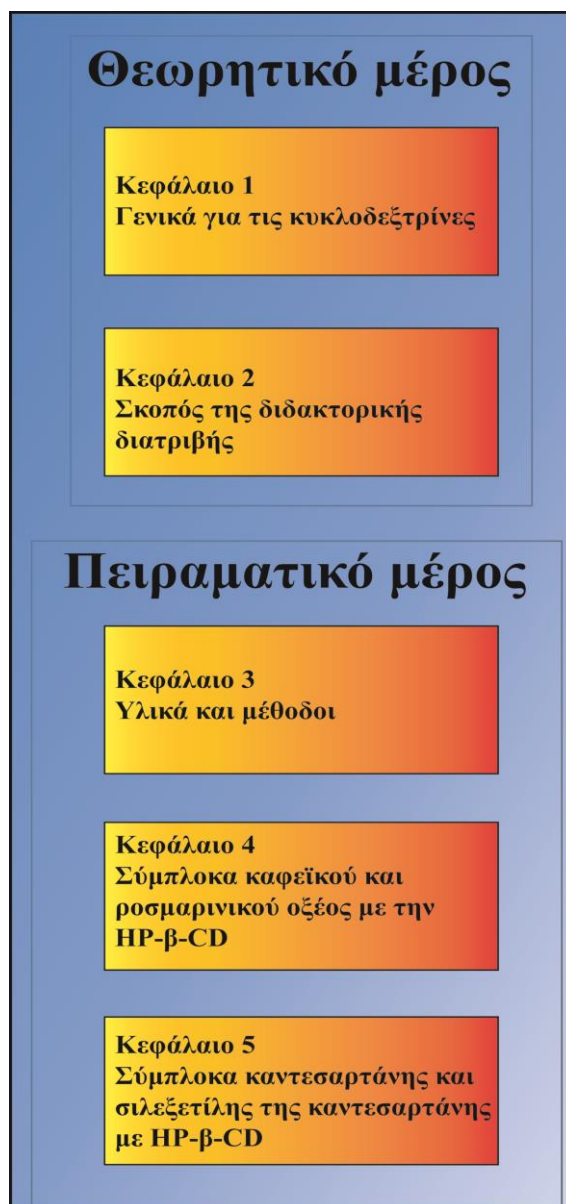
| | |
|--|-----|
| Πίνακας 14 Ανάλυση της μεταβολής της δέσμευσης ελεύθερης ενέργειας για το σύμπλοκο RA-HP-β-CD όπως υπολογίστηκε με τη μέθοδο MM-PBSA. | 114 |
| Πίνακας 15 Υπολογισθείσες αποστάσεις μέσω της ακτινικής συνάρτησης κατανομής μεταξύ της ολιγοϋποκατεστημένης HP-β-CD και του CA..... | 117 |
| Πίνακας 16 Υπολογισθείσες αποστάσεις μέσω της ακτινικής συνάρτησης κατανομής μεταξύ της υψηλά υποκατεστημένης HP-β-CD και του CA..... | 118 |
| Πίνακας 17 Υπολογισθείσες αποστάσεις μέσω της ακτινικής συνάρτησης κατανομής μεταξύ της ολιγοϋποκατεστημένης HP-β-CD και του RA..... | 118 |
| Πίνακας 18 Υπολογισθείσες αποστάσεις μέσω της ακτινικής συνάρτησης κατανομής μεταξύ της υψηλά υποκατεστημένης HP-β-CD και του RA..... | 119 |
| Πίνακας 19 Χημικές μετατοπίσεις της CAN σε υγρής κατάστασης NMR (DMSO), σε στερεάς κατάστασης NMR, σε μίγμα CAN/HP-β-CD και στο συμπλόκο CAN-HP-β-CD. | 130 |
| Πίνακας 20 Μέσες τιμές ενέργειας για το σύμπλοκο CC-HP-β-CD όπως προκύπτουν από τους υπολογισμούς MMPBSA..... | 138 |
| Πίνακας 21 Μέσες τιμές ενέργειας για το σύμπλοκο CAN-HP-β-CD όπως προκύπτουν απ τους υπολογισμούς MMPBSA..... | 140 |
| Πίνακας 22: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων. | 148 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Γενικά για τις κυκλοδεξτρίνες

1.1 Διάρθρωση της διδακτορικής διατριβής

Η παρούσα διδακτορική διατριβη αποτελείται από 5 κεφάλαια, από τα οποία τα 2 πρώτα παρέχουν το θεωρητικό υπόβαθρο και τα κεφάλαια 3-5 περιγράφουν την πειραματική διαδικασία, τα αποτελέσματα, συζήτηση των αποτελεσμάτων και τα συμπεράσματα (Σχήμα 1).

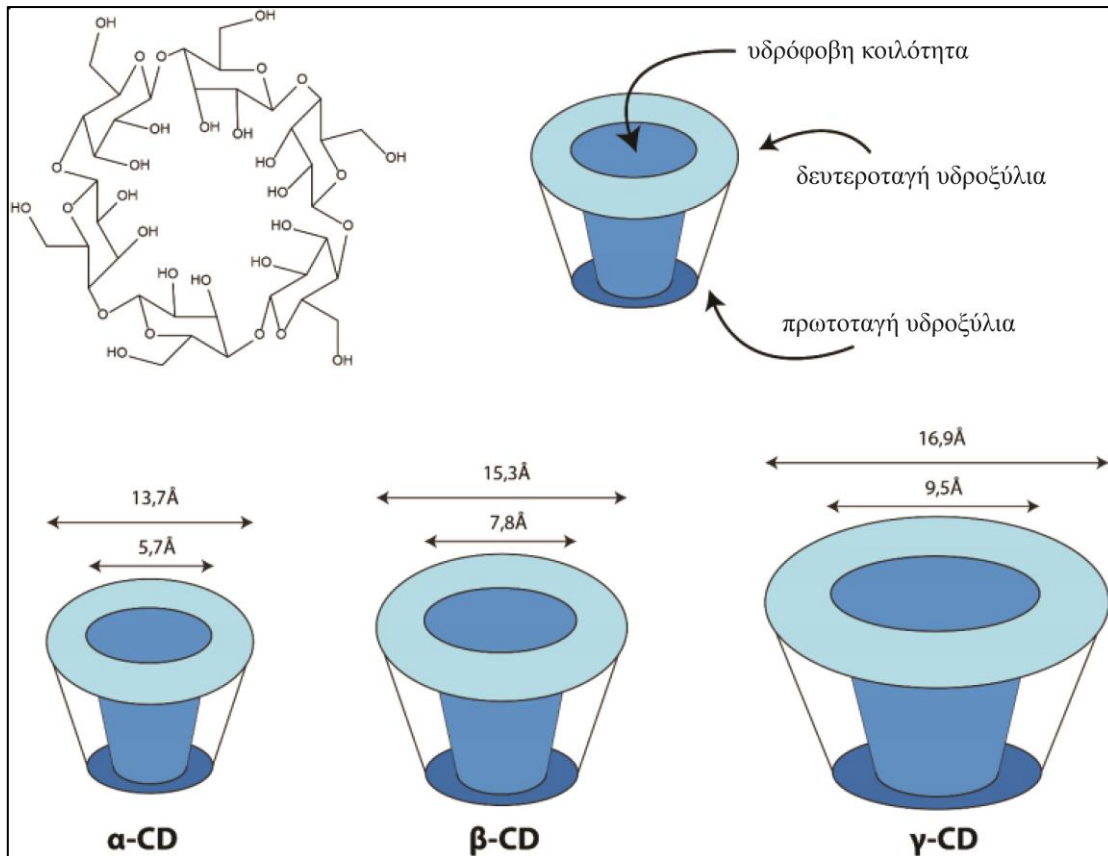


Σχήμα 1 Δομή της διδακτορικής διατριβης.

1.2 Εισαγωγή

Οι κυκλοδεξτρίνες (CDs) αποτελούν μια οικογένεια κυκλικών ολιγοσακχαριτών οι οποίες απαντούν στη φύση και παρουσιάζουν σχήμα κόλουρου κώνου (Σχήμα 2) Το εξωτερικό τους δομικό τμήμα είναι υδρόφιλο και το εσωτερικό υδρόφοβο [1]. Παρασκευάζονται κατά την αποδόμηση του αμύλου μέσω του ενζύμου κυκλοδεξτρίνο-γλυκόζυλοτρανσφεράσης (CGTase) με τη βοήθεια της α-αμυλάσης χρησιμοποιώντας θέρμανση [2]. Δομικά αποτελούνται από μονάδες α-D-γλυκοπυρανόζης που συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς τύπου α-1,4. Κάθε μονάδα γλυκοπυρανόζης περιέχει τρεις υδροξυλομάδες. Οι υδροξυλομάδες αυτές καθιστούν υδρόφιλη την εξωτερική επιφάνεια των κυκλοδεξτρινών και αυξάνουν τη διαλυτότητά τους στο νερό. Οι πρωτοταγείς υδροξυλομάδες βρίσκονται στο στενό άκρο του κώνου, ενώ οι δευτεροταγείς στο ευρύτερο άκρο [3]. Το εσωτερικό των κυκλοδεξτρινών είναι υδρόφοβο, λόγω της παρουσίας των αιθερικών οξυγόνων στο O4 και των υδρογόνων που είναι προσαρτημένα στους άνθρακες C3 και C5, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια κοιλότητα για τον εγκλωβισμό υδρόφοβων μορίων [4]. Η αφθονία των διαθέσιμων υδροξυλομάδων των CDs καθώς και τα διάφορα μεγέθη του δακτυλίου τους οδηγούν σ' ένα πλήθος τροποποιημένων κυκλοδεξτρινών (modified CDs) με διαφορετικές ιδιότητες [5].

Οι πιο κοινές κυκλοδεξτρίνες είναι οι α-,β και γ- κυκλοδεξτρίνες οι οποίες περιέχουν 6, 7 και 8 μόρια γλυκοπυρανόζης αντίστοιχα. Έχουν επίσης παρασκευασθεί κυκλοδεξτρίνες με 9, 10, 11, 12 και 13 μονάδες γλυκοπυρανόζης που ονομάζονται δ, ε, ζ, η, θ κυκλοδεξτρίνες, αντίστοιχα. Παρόλο που οι φυσικές κυκλοδεξτρίνες και τα σύμπλοκα τους είναι υδρόφιλα, η υδατική διαλυτότητα τους είναι αρκετά περιορισμένη, ιδιαίτερα των β-κυκλοδεξτρινών Αυτό πιστεύεται ότι οφείλεται στη σχετικά ισχυρή δέσμευση των μορίων κυκλοδεξτρίνης στην κρυσταλλική κατάσταση (δηλαδή, σχετικά υψηλή ενέργεια κρυσταλλικού πλέγματος [6].



Σχήμα 2 Δομικές μονάδες κυκλοδεξτρινών.

Οι κυκλοδεξτρίνες βρίσκουν εφαρμογή σε μια πληθώρα από βιομηχανικούς κλάδους, όπως τα φυτοφάρμακα, τη φαρμακευτική, τα αρώματα και τα τρόφιμα, αφού είναι βιοσυμβατές [7, 8], δεν προκαλούν ανοσοαντιδράσεις και παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα σε ζώα και ανθρώπους [9]. Οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται σε φαρμακευτικές εφαρμογές για διάφορες χρήσεις, όπως η βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας των φαρμάκων (Πίνακας 1). Σήμερα, περιγράφονται θεραπείες με βάση τις κυκλοδεξτρίνες [10], ενώ εξετάζονται πιθανές μελλοντικές εφαρμογές τους [11]. Επίσης, μελετώνται πολυμερή που περιέχουν κυκλοδεξτρίνες και η χρήση τους στη διάθεση φαρμάκων [12]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρήση πολυμερών με κυκλοδεξτρίνες συμπλοκοποιημένων με νουκλεϊκά οξέα για την αποτελεσματικότερη στόχευση καρκινικών όγκων [13].

Πίνακας 1 Εγκριθέντα για κυκλοφορία στην αγορά σύμπλοκα φαρμάκων-κυκλοδεξτρινών [14].

| Δραστική ουσία | Τρόπος χορήγησης | Εμπορικό όνομα | Αγορά διάθεσης |
|--|-----------------------|-------------------------------|----------------------|
| α-κυκλοδεξτρίνη | | | |
| Αλπροσταδίλη | Ενδοφλέβια | Prostavastin, Caverject, Edex | Ευρώπη, Ιαπωνία, ΗΠΑ |
| Υδροχλωρική κεφοτιάμη της εξιτίλης | Στοματική | Pansporin T | Ιαπωνία |
| Λιμαπρόστη | Στοματική | Opalmon, Prorenal | |
| β-κυκλοδεξτρίνη | | | |
| Benexate | Στοματική | Ulgut, Lomniel | Ιαπωνία |
| Δεξαμεθαζόνη | Δερματική | Glymesason | Ιαπωνία |
| Ιώδιο | Τοποειδική | Mena-Gargle | Ιαπωνία |
| Νικοτίνη | Υπογλώσσια | Nicorette | Ευρώπη |
| Νιμεσουλίδη | Στοματική | Nimedex, Mesulid | Ευρώπη |
| Νιτρογλυκερίνη | Υπογλώσσια | Nitropen | Ιαπωνία |
| Ομεπραζόλη | Στοματική | Omebeta | Ευρώπη |
| Δινοπρόστονη | Υπογλώσσια | Prostarmon E | Ιαπωνία |
| Πιροξικάμη | Στοματική | Brexin | Ευρώπη |
| θειαπροφαινικό οξύ | Στοματική | Surgamyl | Ευρώπη |
| 2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη | | | |
| Σισαπρίδη | Πρωκτική | Propulsid | Ευρώπη |
| Υδροκορτιζόνη | Παρεντερική | Dexocort | Ευρώπη |
| Ινδομεθακίνη | Οφθαλμικές σταγόνες | Indocid | Ευρώπη |
| Ιτρακοναζόλη | στοματική, ενδοφλέβια | Sporanox | Ευρώπη, ΗΠΑ |
| Μιτομυκίνη | Ενδοφλέβια | Mitozytrex | ΗΠΑ |

| | | | |
|---|---------------------|----------------|-------------|
| Τυχαία μεθυλιωμένες β-κυκλοδεξτρίνες | | | |
| B-οιστραδιόλη | Ρινική | Aerodiol | Ευρώπη |
| Χλωραμφαινικόλη | Οφθαλμικές σταγόνες | Clorocil | Ευρώπη |
| Σουλφονυλιωμένες β-κυκλοδεξτρίνες | | | |
| Βορικοναζόλη | Ενδοφλέβια | Vfend | Ευρώπη, ΗΠΑ |
| Ζιπρασιδόνη | Ενδομυϊκή | Geodon, Zeldox | Ευρώπη, ΗΠΑ |
| 2-υδροξυπροπυλο-γ-κυκλοδεξτρίνη | | | |
| Νατριούχος δικλοφαινάκη | Οφθαλμικές σταγόνες | Voltaren | Ευρώπη |

Η υδατοδιαλυτότητα καθώς και η λιποφιλία των βιοδραστικών μορίων είναι σημαντικές παράμετροι για την τελική επιλογή τους ως φάρμακα. Διαλυτότητα μικρότερη από 0,1 mg/mL ισοδυναμεί με ελάχιστη διαλυτότητα και άρα δυσκολία της κυκλοφορίας του μορίου στο σώμα με συνέπεια τη δυσκολία της εξεύρεσης του μοριακού του στόχου. Μεγάλη διαλυτότητα είναι επίσης ανεπιθύμητη καθώς οδηγεί σε μικρή τάση διαχωρισμού από την υδατική φάση και μειωμένη διάχυση στις λιπόφιλες βιομεμβράνες.

Σύγχρονες μελέτες για την εξεύρεση νέων φαρμακευτικών μορίων οδηγούν συχνά σ' ένα αυξανόμενο αριθμό λιπόφιλων και άρα αδιάλυτων στο νερό ενώσεων [15]. Τα φαρμακευτικά αυτά μόρια κατατάσσονται είτε στην κλάση II δηλαδή στα ελάχιστα διαλυτά με υψηλή διαπερατότητα (η οποία πρέπει να είναι μεγαλύτερη από $2-4 \times 10^{-14}$ cm/sec), είτε στην κλάση IV δηλαδή στα ελάχιστα διαλυτά με χαμηλή διαπερατότητα σύμφωνα με το Σύστημα Βιοφαρμακευτικής Ταξινόμησης (Πίνακας 2) [16]. Στη φαρέτρα της σύγχρονης φαρμακευτικής χημείας υπάρχουν μέθοδοι αντιμετώπισης του προβλήματος της μειωμένης διαλυτότητας σε ενώσεις που ανήκουν στις κατηγορίες II και IV. Αύξηση της διαλυτότητας με ταυτόχρονη διατήρηση της λιποφιλίας μπορεί να επιτευχθεί με μείωση του μεγέθους των σωματιδίων [17], σχηματισμό άλατος [18],

συμπλοκοποίηση [19] καθώς και με διαλύματα φαρμάκου σε λιποσώματα και μη-υδατικούς διαλύτες [20].

Πίνακας 2 Σύστημα βιοφαρμακευτικής ταξινόμησης, στο οποίο τα φάρμακα χωρίζονται σε 4 τύπους ανάλογα με τα χαρακτηριστικά διαλυτότητας και διαπερατότητας τους. Ως διαλυτότητα φαρμάκου ορίζεται η αναλογία δόσης/διαλυτότητα και ένα φάρμακο χαρακτηρίζεται ως διαλυτό, όταν η υψηλότερη δόση που ορίζεται για ανθρώπινη χρήση θα διαλύεται σε 250 mL ύδατος.

| | |
|--|---|
| Τύπος I ↑ διαλυτότητα, ↑ διαπερατότητα | Τύπος II ↓ διαλυτότητα, ↑ διαπερατότητα |
| Τύπος III ↑ διαλυτότητα, ↓ διαπερατότητα | Τύπος IV ↓ διαλυτότητα, ↓ διαπερατότητα |

1.3 Ιστορική αναδρομή

1.3.1 Τα πρώτα βήματα: 1891-1930

Οι κυκλοδεξτρίνες απομονώθηκαν πρώτη φορά από τον φαρμακοποιό και χημικό Antoine Villiers ο οποίος περιέγραψε τις ιδιότητες των "cellulosines" [21] το 1891 στα Πρακτικά της Ακαδημίας Επιστημών (Proceedings of the Académie des Sciences). Ο Villiers παρατήρησε ότι το άμυλο από την πατάτα μετατρέπεται μέσω βουτυρικής ζύμωσης (butyric fermentation) σε μεγαλύτερο ποσοστό σε δεξτρίνες. Δεξτρίνες εκείνη την εποχή ονομάζονταν τα προϊόντα αποικοδόμησης και τα ενδιάμεσα παράγωγα αποσύνθεσης (decomposition) του αμύλου. Η ανακάλυψη της αποικοδόμησης του αμύλου με μια διαφορετική μέθοδο, τη θέρμανση, ήταν ήδη γνωστή εκείνη την εποχή [22]. Χρησιμοποιώντας αφομοιωμένο άμυλο από τον *Bacillus amylobacter* (ο οποίος περιείχε θερμοανθεκτικά σπόρια του *Bacillus macerans*) ο Villiers κατάφερε να απομονώσει 3 g μιας κρυσταλλικής ουσίας από 1000 g αμύλου και προσδιόρισε τον μοριακό της τύπο ως $(C_6H_{10}O_5) \cdot 3H_2O$. Η ονομασία "cellulosine" προέκυψε από τις παρεμφερείς ιδιότητες της ουσίας με την κυτταρίνη όπως αντοχή στην όξινη υδρόλυση και απουσία αναγωγικής ικανότητας. Στη μελέτη του επίσης αναφέρεται η ύπαρξη δυο διακριτών δομών, πιθανότατα η α -CD και β -CD.

Το 1903, ο Αυστριακός χημικός Franz Schardinger ανακάλυψε ότι μια μορφή ενός εξαιρετικά θερμοανθεκτικού μικροοργανισμού μπορούσε να αποδημήσει το άμυλο και να παράγει κρυσταλλικά παραπροϊόντα παρόμοια με τα "cellulosines" του Villiers [25, 26]. Ονόμασε το απομονωμένο μικρόβιο *Bacillus Macerans*. Κατά τη διαδικασία της αποδόμησης παρατήρησε δύο διακριτές δομές από τις οποίες το κύριο προϊόν ήταν η α-δεξτρίνη [23]. Η β-δεξτρίνη που απομονώθηκε είχε ακριβώς τις ίδιες ιδιότητες με αυτές που παρατήρησε ο Villiers και οι κρυσταλλικές ουσίες μπορούσαν να διαχωριστούν μέσω της αντίδρασης συμπλοκοποίησης ιωδίου [27-29]. Το ενυδατωμένο σύμπλοκο α-δεξτρίνης σε λεπτές στρώσεις παρουσιάζει μπλε χρώμα ενώ το ξηρό γκρι-πράσινο. Το ενυδατωμένο σύμπλοκο β-δεξτρίνης είναι κόκκινο-καφέ είτε νωπό ή ξηρό. Ο Schardinger με την οξύνοια του και τις μεθόδους που χρησιμοποίησε, καθόρισε τις βασικές αρχές της χημείας των κυκλοδεξτρινών.

Τα επόμενα χρόνια μέχρι και το 1930 υπήρξε σημαντικό ενδιαφέρον για τις συγκεκριμένες δεξτρίνες με κύριο εκφραστή της ερευνητικής τάσης τον Prinsheim [24]. Δημοσίευσε εκτενώς με πολλούς συνεργάτες, αλλά οι μελέτες τους είναι περιορισμένης αξίας. Η μεγαλύτερη αδυναμία αυτών των μελετών έγκειται στο γεγονός ότι διεξήγαγαν ερευνητική δραστηριότητα με ελλιπώς διαχωρισμένα κλάσματα και ανεπαρκείς μεθόδους, για παράδειγμα, κρυσκοπικούς προσδιορισμούς του μοριακού βάρους. Πολλές εργασίες του Pringsheim περιέχουν αβάσιμες εικασίες, και η πλειοψηφία των δημοσιευμένων πειραματικών δεδομένων είναι αναξιόπιστα [22]. Η αξία ωστόσο όλων αυτών των μελετών ήταν η ανακάλυψη ότι οι κρυσταλλικές δεξτρίνες και οι αιθυλεστέρες τους παρουσιάζουν υψηλή τάση να σχηματίζουν σύμπλοκα με διάφορες οργανικές ενώσεις.

1.3.2 Συστηματικές μελέτες των κυκλοδεξτρινών και των συμπλόκων εγκλεισμού τους: 1930-1970

Στη δεκαετία του 1930 οι κρυσταλλικές δεξτρίνες του Schardinger μελετήθηκαν εκτεταμένα από τον Freudenberg, τον Karrer [25] και τον Miekeley [25], οι οποίοι κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι αποτελούνται από μονάδες μαλτόζης και περιέχουν α1-4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Ο Freudenberg συγκεκριμένα κατέληξε

σε αυτό το συμπέρασμα ύστερα από πειράματα ενζυματικής υδρόλυσης [26] ακετόλυσης αιθανοϋλοβρωμιδίου και υδρόλυσης των υπερμεθυλιωμένων δεξτρινών [27, 28]. Το 1936, έγινε η πρώτη περιγραφή μεθόδου για απομόνωση ομογενών και καθαρών κλασμάτων και τεκμηριώθηκε η κυκλική δομή τους [26]. Η γ-κυκλοδεξτρίνη ανακαλύφθηκε το 1948 ενώ χρειάστηκαν δύο ακόμα χρόνια για να διευκρινιστεί η δομή της [29].

Το 1942 οι French και Rudle, υπολόγισαν τα μοριακά βάρη των α- και β-δεξτρινών χρησιμοποιώντας τεχνικές περίθλασης ακτίνων X (X-ray diffraction) και πυκνότητας κρυσταλλικού στερεού (crystal density). Ταυτόχρονα, μετρήθηκαν οι μονάδες γλυκόζης τους και βρέθηκαν έξι για την α-κυκλοδεξτρίνη και επτά για τη β- [30]. Ειδικότερα, ανακάλυψαν ότι τα μοριακά βάρη των κυκλοδεξτρινών αποτελούσαν πολλαπλάσια του 162,1 [23].

Η πρώτη αναλυτική επισκόπηση για τις κυκλοδεξτρίνες δημοσιεύθηκε το 1957 από τον French [31]. Η επισκόπηση παρείχε πολλές χρήσιμες πληροφορίες για τη φύση των κυκλοδεξτρινών αλλά έσφαλε στην εκτίμηση για την τοξικότητά τους, πιθανώς λόγω τοξικών προσμίξεων που κατανάλωσαν οι αρουραίοι στα πειράματα. Η επισκόπηση αυτή, μέχρι να γίνουν κατάλληλες τοξικολογικές μελέτες τα υπόλοιπα 20 χρόνια, αποθάρρυνε τους περισσότερους ερευνητές από την ανάπτυξη προϊόντων για ανθρώπινη χρήση.

Το 1967, ο Friedrich Cramer πρότεινε τον μηχανισμό δημιουργίας συμπλόκων εγκλεισμού μεταξύ του π-νιτροφαινολικού νατρίου (sodium p-nitrophenolate) και α-CD [32]. Διαχώρισε τη διαδικασία σε πέντε διακριτά στάδια:

1. Το φιλοξενούμενο μόριο (guest molecule) πλησιάζει τη κυκλοδεξτρίνη. Στη συνέχεια, τα μόρια του νερού απομακρύνονται από την κοιλότητα του ξενιστή. Οι van der Waals αλληλεπιδράσεις και ο αριθμός των δεσμών υδρογόνου μειώνονται, ενώ οι βαθμοί ελευθερίας του αδεσμεύτου νερού αυξάνονται.
2. Το φιλοξενούμενο μόριο απελευθερώνεται από το στρώμα νερού που το περιβάλλει. Το στρώμα νερού διασκορπίζεται και αναδιοργανώνεται.
3. Το φιλοξενούμενο μόριο το οποίο θεωρείται για λόγους απλοποίησης ότι βρίσκεται στην αέρια φάση εισέρχεται στην κοιλότητα και σταθεροποιείται από δυνάμεις van der Waals και/ή δεσμούς υδρογόνου.

4. Τα μόρια νερού δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τους.
5. Η συνολική δομή των νερών αποκαθίσταται γύρω από το τμήμα του υποστρώματος που βρίσκεται σε επαφή με τον διαλύτη.

Συνοπτικά, στη χρονική περίοδο αυτή με βάση τη βιβλιογραφία υπήρχε ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις κυκλοδεξτρίνες προς βιομηχανική χρήση, υπήρχαν διαθέσιμες σε υψηλή καθαρότητα αλλά είχαν τα μειονεκτήματα του υψηλού κόστους και της τοξικότητας στους ανθρώπους.

1.3.3 Σύγχρονη εποχή: 1970-σήμερα

Το 1973, έπειτα από έρευνες του βιοχημικού Wolfram Saenger απέδειξε ότι οι κυκλοδεξτρίνες αποτελούνται από μακροκυκλικές δομές που σχηματίζουν μια εσωτερική κοιλότητα και ομοιάζουν με κόλouro κώνο [33]. Με τα πειράματα του που βασίστηκαν σε τεχνικές περίθλασης ακτίνων X και νετρονίων, αρχικά κατάφερε να παρατηρήσει ότι τα μόρια νερού στην κοιλότητα δεν έχουν συγκεκριμένη διάταξη. Το 1976, πρότεινε τον μηχανισμό για τη δημιουργία συμπλόκων εγκλεισμού της α-CD σε υδατικό διάλυμα ως εξής:

1. Το φιλοξενούμενο μόριο αυτομάτως αντικαθιστά τα μόρια νερού στην κοιλότητα.
2. Τα μόρια κυκλοδεξτρίνης απορροφούν την ενέργεια των μορίων νερού και λαμβάνουν μια υψηλότερη ενεργειακά διαμόρφωση (σε αυτή την κατάσταση τα μόρια νερού μπορούν εύκολα να αντικατασταθούν με δεύτερο φιλοξενούμενο μόριο (guest molecule)).
3. Το φιλοξενούμενο μόριο αλληλεπιδρά με την εξωτερική επιφάνεια της κυκλοδεξτρίνης και εισέρχεται στην κοιλότητα μόνο όταν έχει απορροφήσει την ενέργεια ενεργοποίησης (τη διαφορά της υψηλότερα ενεργειακής διαμόρφωσης CD-νερού από τη χαμηλότερη ενεργειακή CD-φιλοξενούμενου μορίου)

Οι Bergeron και Rowan [34], με χρήση τεχνικών NMR εξήγησαν το φαινόμενο της συμπλοκοποίησης μέσω των δυνάμεων London καθώς και την ευνοϊκή αντικατάσταση των μορίων νερού της κοιλότητας που βρίσκονται υψηλότερα ενεργειακά.

Στη σύγχρονη εποχή, είναι γνωστό ότι σημαντικό ρόλο στη συμπλοκοποίηση κατέχουν οι υδροφοβικές, van der Waals και διπόλου-διπόλου αλληλεπιδράσεις [35]. Η ευνοϊκή μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας κατά τη συμπλοκοποίηση προσδίδεται κυρίως στην εξαγωγή των μορίων νερού της υδρόφοβης κοιλότητας που έχει ως συνέπεια την ευνοϊκή μεταβολή της εντροπίας [36].

Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις κυκλοδεξτρίνες οδήγησε στη διοργάνωση το 1981, του πρώτου Διεθνούς Συνεδρίου για τις Κυκλοδεξτρίνες και από το 1984 και ύστερα επαναλαμβάνεται κάθε δύο χρόνια. Στο συνέδριο παρουσιάζονται 120-150 διαλέξεις που παρέχουν τα πιο πρόσφατα αποτελέσματα και καινοτομίες [37, 38]. Παράλληλα, η μαζική βιομηχανική παραγωγή καθαρής κυκλοδεξτρίνης έχει οδηγήσει στη σημαντική μείωση του κόστους της β-κυκλοδεξτρίνης από 2000\$ το κιλό στις ΗΠΑ το 1970 σε 2-4 ευρώ σήμερα. Επιπλέον, υπάρχουν διαθέσιμες α, γ κυκλοδεξτρίνες καθώς και παράγωγα με βελτιστοποιημένες ιδιότητες όπως για παράδειγμα την αυξημένη διαλυτότητα ή βιοδιαθεσιμότητα [39].

1.4 Οι κυκλοδεξτρίνες ως συστήματα μεταφοράς φαρμακευτικών μορίων στους μοριακούς τους στόχους

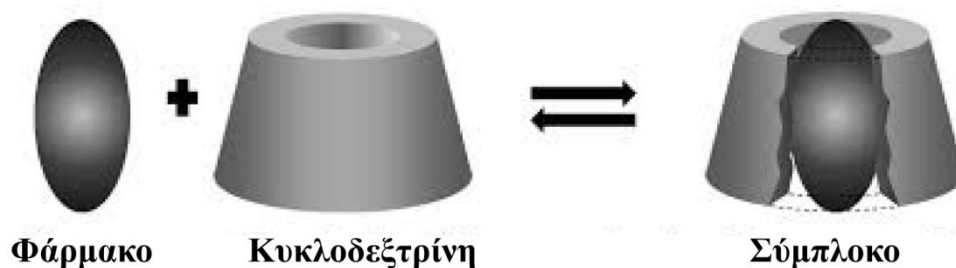
1.4.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες που ευνοούν τη συμπλοκοποίηση

Η δυνατότητα συμπλοκοποίησης των κυκλοδεξτρινών με φαρμακευτικά μόρια, η οποία οδηγεί αναπόφευκτα σε πληθώρα φαρμακευτικών εφαρμογών, είναι συνέπεια των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους:

- i. Η μοριακή τους δομή αποτελείται από ένα δύσκαμπτο (rigid) δακτύλιο ο οποίος περιέχει τα πρωτοταγή και δευτεροταγή υδροξύλια στις τελικές θέσεις, ενώ οι δεσμοί C-H, C-C και C-O-C βρίσκονται στο εσωτερικό της κοιλότητας. Κατά αυτόν τον τρόπο, δημιουργείται μια υδρόφοβη επιφάνεια εντός και μια υδρόφιλη εξωτερικά, κατάλληλη για να φιλοξενήσει φαρμακευτικά υδρόφοβα μόρια [40].
- ii. Η διαλυτότητα τους στο νερό υπολογίζεται στα 12,8%, 1,8% και 25,6% (w/w) για την α-, β- και γ-κυκλοδεξτρίνη αντίστοιχα σε θερμοκρασία δωματίου [41]. Η ιδιότητα αυτή προσφέρεται για την αύξηση της διαλυτότητας λιπόφιλων ενώσεων [42].

- iii. Η υγροσκοπικότητα τους υπολογίζεται στα 10,2%,14,5% και 17,7% για την α-, β- και γ-κυκλοδεξτρίνη αντίστοιχα [43]. Τα ποσοστά υγρασίας τους οδηγούν σε μια εύχρηστη πούδρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- iv. Η χημική τους σταθερότητα, παρουσιάζει σχετικά μεγάλη αντοχή στην υδρόλυση και τα οξέα [44].
- v. Η θερμική τους σταθερότητα είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με το άμυλο. Η κυκλοδεξτρίνη τήκεται με ταυτόχρονη αποσύνθεση στους 300 °C όπως αποδεικνύεται από πειράματα διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry) [6].

Οι ευνοϊκές ιδιότητες των κυκλοδεξτρινών τις καθιστούν ικανές να φιλοξενήσουν ένα εκτεταμένο φάσμα φαρμακευτικών μορίων. Στην περίπτωση όπου τα μόρια των φαρμάκων είναι ικανοποιητικού μεγέθους και παρουσιάζουν κατάλληλες ιδιότητες για τη δημιουργία συμπλόκου εγκλεισμού, δημιουργείται μια δυναμική ισορροπία μεταξύ των ελεύθερων κυκλοδεξτρινών, των ελεύθερων μορίων των φαρμάκων και των σχηματισθέντων συμπλόκων εγκλεισμού (Σχήμα 3)



Σχήμα 3 Φάρμακο κατάλληλου μεγέθους μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκο με τις κυκλοδεξτρίνες. Το σύμπλοκο αυτό βρίσκεται σε μια δυναμική ισορροπία με την ελεύθερη μορφή του φαρμάκου.

Οι περισσότερες κυκλοδεξτρίνες λόγω του υψηλού μοριακού βάρους, του μεγάλου αριθμού των δοτών και δεκτών υδρογόνου και της υψηλής υδροφιλίας τους ($\log K_{o/w}$ μεταξύ -8 and -12), παρουσιάζουν *per os* βιοδιαθεσιμότητα μικρότερη από 4% [4]. Η από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα της HP-β-CD στους ανθρώπους είναι μεταξύ 0,5 και 3,3%, με το 50-65% της συνολικής

ποσότητας να απεκκρίνεται ανεπάφη στα κόπρανα και το υπόλοιπο να μεταβολίζεται κυρίως από βακτήρια στο κόλον. Οι κυκλοδεξτρίνες που απορροφήθηκαν απεκκρίνονται χωρίς μεταβολές και γρήγορα στα ούρα. Τοξικολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι κυκλοδεξτρίνες που χορηγούνται από το στόμα είναι πρακτικά μη τοξικές λόγω της έλλειψης απορρόφησης από τη γαστρεντερική οδό [45]. Επιπλέον, η HP-β-CD μπορεί να λειτουργήσει και ως φάρμακο.

1.4.2 Η χρήση των κυκλοδεξτρίνων στις φαρμακοτεχνικές μορφές (drug formulations)

Η συνταγοποίηση είναι μια περίπλοκη διαδικασία στην οποία τα ενεργά φαρμακευτικά συστατικά μαζί με τα έκδοχα στοχεύουν μαζί προς το όργανο ή το κύτταρο για την άσκηση ευεργετικών επιδράσεων στην ανθρώπινη υγεία. Τα συνταγοποιημένα σκευάσματα αποτελούν συνθέσεις που μπορούν να παρασκευαστούν σε κάψουλα, δισκία, γαλάκτωμα ή άλλη μορφή σύμφωνα με μια συγκεκριμένη διαδικασία. Είναι επιτακτική η ανάγκη για βελτιστοποιημένες φαρμακοτεχνικές μορφές οι οποίες θα: (i) ενισχύουν τη διαδικασία χορήγησης φαρμάκου βοηθώντας το φάρμακο να περάσει τα φυσιολογικά, βιοχημικά και χημικά εμπόδια, (ii) βελτιώνουν τη διαλυτότητα του φαρμάκου, τη σταθερότητα και τον ρυθμό διάλυσης, (iii) επιτυγχάνουν ελεγχόμενο ρυθμό τροφοδοσίας (iv) παρέχουν βελτιωμένο θεραπευτικό αποτέλεσμα, (v) παρουσιάζουν ευνοϊκότερο προφίλ παρενεργειών, (vi) ενισχύουν τη συμμόρφωση του ασθενούς μέσω της ευκολίας χρήσης ή μειώνοντας τη δοσολογία [46].

Η χημική δομή του φαρμάκου αντανακλά τις φυσικοχημικές του ιδιότητες και συνεπώς την κατάλληλη συνταγοποίηση που απαιτείται για την αποτελεσματική απελευθέρωσή του και τη βέλτιστη δράση. Διάφορες γενικές συνθέσεις έχουν προταθεί για χορήγηση φαρμάκου, κατάλληλες για διάφορες κατηγορίες μορίων φαρμάκου. Καμία δεν παρέχει μια καθολική πλατφόρμα για τον έλεγχο της απελευθέρωσης του φαρμάκου καθώς καμία από αυτές δεν στερείται προβλημάτων [46].

1.4.3 Παραδείγματα φαρμακοτεχνικών μορφών κυκλοδεξτρινών

Η PGE₂ (προσταγλαδίνη E₂), η οποία παρουσιάζει ισχυρή δράση παρόμοια με της οξυτοκίνης και αποτελεί πιθανό παράγοντα πρόκλησης τοκετού, χορηγήθηκε

για πρώτη φορά με κυκλοδεξτρίνες [47, 48]. Οι προσταγλαδίνες είναι πολύ ασταθείς, χαρακτηριστικό που αποτελούσε τροχοπέδη για την παρασκευή και ανάπτυξή τους. Τα σύμπλοκα PGE με β-κυκλοδεξτρίνες οδηγούν στην αύξηση της σταθερότητάς τους σε στερεά κατάσταση και ένα προϊόν σχεδιασμένο σε αυτή τη βάση που περιείχε τη δραστική ουσία δινοπροστόνη συμπλοκοποιημένη με β-CD (εμπορικό όνομα Prostarmon E, Ono) εγκρίθηκε για κυκλοφορία στην αγορά της Ιαπωνίας το 1976. Το Prostarmon E παρουσιάζει υψηλή βιοδραστικότητα και αποτελεί σημαντική ιατρική πρόοδο, ιδίως στην πρόκληση τοκετού σε άτομα με ευαισθησία στην ωκυτοκίνη ενώ ταυτόχρονα μειώνει την αιμορραγία μετά τον τοκετό.

Η ανδρική στυτική δυσλειτουργία μπορεί να αντιμετωπιστεί με σύμπλοκο α-κυκλοδεξτρίνης αλπροσταδίνης το οποίο χορηγείται μέσω ενδοσηραγγώδους έγχυσης [49, 50]. Το σύμπλοκο PGE1-α-CD βρέθηκε να είναι αποτελεσματικό σε άτομα που δεν ανταποκρίνονταν στην κιτρική σιλδεναφίλη (Viagra, Pfizer), ένα από του στόματος αναστολέα της 5-φωσφοδιεστεράσης.

Τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAID) χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του πόνου [51]. Σημαντικά μειονεκτήματα τους περιλαμβάνουν τον ερεθισμό του ανώτερου πεπτικού συστήματος και την πιθανή πρόκληση αιμορραγίας. [52]. Η πιροξικάμη (Feldene, Pfizer) αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα στη βιβλιογραφία. Είναι χρήσιμη για την αντιμετώπιση της οστεοαρθρίτιδας και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, καθώς και της ουρικής αρθρίτιδας, οξέων μυοσκελετικών διαταραχών και δυσμηνόρροιας [53, 54].

Παρουσιάζει σχετικά μεγάλο φαρμακοκινητικό χρόνο ημίσειας ζωής, που σημαίνει ότι μπορεί να λαμβάνεται μια φορά την ημέρα, αντίθετα με πολλά άλλα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη. Είναι πολύ λίγο υδατοδιαλυτή (~30 μg/ml), με χαμηλή διαβρεξιμότητα (σε γωνία επαφής 70°) και κρυσταλλώνεται εύκολα με σημείο τήξης 202 °C και ΔH_{melt} 106 J/g [55, 56].

Οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιήθηκαν στις ενώσεις αυτές σε μια προσπάθεια να βελτιωθούν ορισμένες ιδιότητες, όπως η ασφάλεια και το ποσοστό διάλυσης του φαρμάκου. Αυτά τα βελτιωμένα χαρακτηριστικά μείωσαν τον ερεθισμό του πεπτικού συστήματος, και επέτρεψαν την ταχύτερη απορρόφηση του φαρμάκου καθώς και τη γρηγορότερη έλευση της αναλγητικής δράσης. Μελέτες για τη

δημιουργία συμπλόκων έδειξαν ότι γραμμομοριακό κλάσμα 2,5:1 ήταν το βέλτιστο για τον συνδυασμό φαρμάκου-κυκλοδεξτρίνης και δεδομένης της χαμηλής δόσης της πιροξικάμης (20mg), δεν απαιτείται υπερβολική ποσότητα πρώτης ύλης στο σκεύασμα. Η διαλυτότητα της πιροξικάμης στο σκεύασμα της β-κυκλοδεξτρίνης αυξήθηκε κατά πέντε φορές σε σχέση με την ουσία του φαρμάκου χωρίς το σύμπλοκο. Στην αρχή, αυτή η αυξημένη διαλυτότητα συσχετίστηκε με αυξημένο ποσοστό διάλυσης και με υψηλότερα πλασματικά επίπεδα στον άνθρωπο, που με τη σειρά τους συσχετίστηκαν άμεσα με το αυξημένο ποσοστό απορρόφησης [57, 58]. Δε σημειώθηκε καμία διαφορά στον χρόνο της τελικής ημίσειας ζωής όταν συγκρίθηκε η πιροξικάμη με το σύμπλοκο πιροξικάμης-β-CD. Ως προς την αποτελεσματικότητα, το σύμπλοκο πιροξικάμης-β-CD έχει δείξει ότι παρουσιάζει ταχύτερη έλευση του αναλγητικού αποτελέσματος σε διάφορες κλινικές δοκιμές [59].

Παρότι οι διαφορές στην ανεκτικότητα της πιροξικάμης και του συμπλόκου της με τη β-κυκλοδεξτρίνη απαιτούν την ανάλυση επιδημιολογικών δεδομένων, οι μελέτες οξείας τοξικότητας θα μπορούσαν να δώσουν κάποια χρήσιμα στοιχεία. Αρκετές μελέτες που έχουν αξιολογήσει την ενδοσκοπική εμφάνιση του στομάχου εθελοντών που λαμβάνουν είτε πιροξικάμη ή το σύμπλοκο πιροξικάμης-β-CD, έχουν καταδείξει σημαντικά βελτιωμένα αποτελέσματα στην περίπτωση χορήγησης του φαρμάκου με το σύμπλοκο [60, 61]. Παρομοίως, ραδιο-σημασμένα υποστρώματα έδειξαν λιγότερες γαστρικές βλάβες με το σύμπλοκο πιροξικάμης-β-CD σε σύγκριση με την πιροξικάμη [57]. Υπάρχουν διαθέσιμα αρκετά προϊόντα πιροξικάμης-β-CD στην αγορά, όπως το Brexin (Chiesi) και το Cicladol (Chiesi).

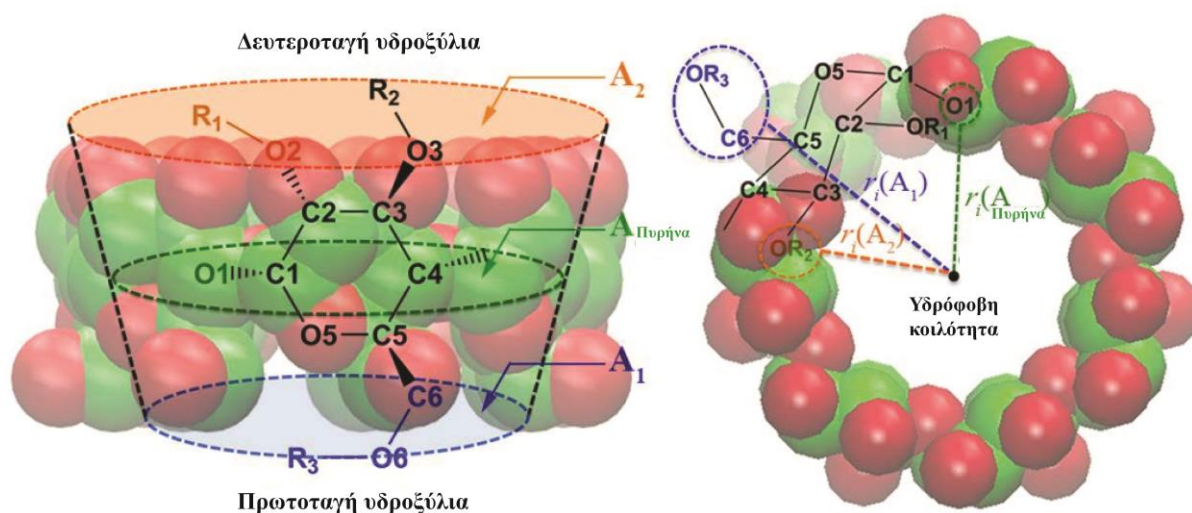
1.5 Η διάθεση των φαρμάκων μέσω κυκλοδεξτρινών σε διάφορα συστήματα χορήγησης

Εξαιτίας της βιοδιαθεσιμότητας και των πολυ-λειτουργικών χαρακτηριστικών τους, οι κυκλοδεξτρίνες είναι ικανές για την εξάλειψη των ανεπιθύμητων ιδιοτήτων του μορίου του φαρμάκου σε διάφορες οδούς χορήγησης μέσω του σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού. Σ' ένα στοματικό σύστημα παροχής φαρμάκου, οι υδρόφιλες και οι ιοντιζόμενες κυκλοδεξτρίνες μπορούν να χρησιμεύσουν ως ισχυροί φορείς βιοδραστικής ουσίας στα συστήματα άμεσης

και καθυστερημένης αποδέσμευσης, ενώ ο ρυθμός απελευθέρωσης των υδατοδιαλυτών φαρμάκων μπορεί να επιβραδυνθεί με υδρόφοβες CDs. Δεδομένου ότι οι κυκλοδεξτρίνες είναι σε θέση να παρατείνουν τη λειτουργία των φαρμακευτικών προσθέτων, ο συνδυασμός μοριακής ενθυλάκωσης με άλλα υλικά φορέα θα καταστεί αποτελεσματικός και θα αποτελέσει ένα πολύτιμο εργαλείο για τη βελτίωση της συνθέσεως του φαρμάκου. Επιπλέον, το πιο επιθυμητό χαρακτηριστικό για ένα φορέα βιοδραστικής ουσίας είναι να μεταφέρει με μεγάλη ακρίβεια μια συγκεκριμένη ποσότητα αυτής σε θέσεις στόχους για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα. Συνδέοντας λοιπόν μια βιοδραστική ουσία με μια κυκλοδεξτρίνη μπορούμε να επιτύχουμε τη δημιουργία ενός ευέλικτου μέσου μιας νέας κατηγορίας προφαρμάκων που στοχεύουν στο παχύ έντερο. Γνωρίζοντας λοιπόν τα παραπάνω, μπορούν να προσδιοριστούν τα πλεονεκτήματα και να αντιμετωπιστούν τα προβλήματα κατά τη χρήση των κυκλοδεξτρινών σ' ένα στοματικό σύστημα χορήγησης.

Από άποψη βελτιστοποίησης της φαρμακοθεραπείας, η απελευθέρωση θα πρέπει να ελέγχεται σύμφωνα με τον θεραπευτικό σκοπό και τις φαρμακολογικές ιδιότητες των δραστικών ουσιών. Υπήρξε αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη ενός συστήματος που θα έχει τη δυνατότητα να ελέγχει τον ρυθμό και τον χρόνο απελευθέρωσης μιας βιοδραστικής ουσίας, γιατί η κατάλληλη αποδέσμευση του φαρμάκου από μια δοσολογία είναι κρίσιμης σημασίας για τη θεραπευτική αποτελεσματικότητά του [62]. Προκειμένου να σχεδιαστούν πιο προηγμένες μορφές δοσολογίας, αναπτύσσονται διάφοροι μεταφορείς υλικών για την αποτελεσματική και με μεγάλη ακρίβεια μεταφορά της επιθυμητής ποσότητας φαρμάκου σε θέσεις στόχους για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα [63]. Οι κυκλοδεξτρίνες είναι δυνητικοί υποψήφιοι για έναν τέτοιο ρόλο, λόγω της ικανότητάς τους να συμπλοκοποιούνται με βιοδραστικές ενώσεις ή να δρουν ως λειτουργικοί μεταφορείς υλικών στις διάφορες φαρμακομορφές [64, 65]. Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των CDs είναι ότι σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού τόσο σε διάλυμα όσο και σε στερεά κατάσταση, στα οποία κάθε φιλοξενούμενο μόριο περιβάλλεται από το υδρόφοβο περιβάλλον της κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολή των φυσικών, χημικών και βιολογικών ιδιοτήτων των φιλοξενούμενων μορίων και να αποκτήσουν τελικά σημαντική φαρμακευτική δυναμική. Πρόσφατα, ένας αριθμός

τροποποιημένων κυκλοδεξτρινών και σύμπλοκα πολυμερών-κυκλοδεξτρινών έχουν σχεδιαστεί για να επιτύχουν μεγαλύτερες δυνατότητες ένταξης απ' ό,τι οι μητρικές κυκλοδεξτρίνες (Πίνακας 3) [66]. Η β-CD είναι η πιο κοινή μητρική CD και περιέχει 21 ομάδες υδροξυλίου, 7 από τις οποίες είναι πρωτοταγείς και οι υπόλοιπες 14 δευτεροταγείς (Σχήμα 4). Όλες αυτές οι ομάδες υδροξυλίου είναι διαθέσιμες ως σημεία εκκίνησης για δομικές τροποποιήσεις. Επομένως διάφορες λειτουργικές ομάδες έχουν εισαχθεί στον μακροκυκλικό δακτύλιο. Έτσι, οι φυσικές και τροποποιημένες CDs έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για τη βελτίωση διαφόρων ιδιοτήτων του φαρμάκου, όπως η διαλυτότητα, η σταθερότητα, η ταχύτητα διάλυσης και η βιοδιαθεσιμότητα [67-70].



Σχήμα 4 Η β-CD περιέχει 21 ομάδες υδροξυλίου, 7 από τις οποίες είναι πρωτοταγείς και οι υπόλοιπες 14 δευτεροταγείς. Οι άνθρακες C3 και C2 βρίσκονται εντός της υδρόφοβης κοιλότητας ενώ οι άνθρακες C4, C5 και C6 βρίσκονται εκτός [71].

Πίνακας 3 Χρήσιμα παράγωγα της β-CD στη φαρμακευτική [72].

| Παράγωγο | Θέση Υποκαταστάτη | Υποκαταστάτης |
|----------------------|----------------------|--------------------|
| Τα υδρόφιλα παράγωγα | | |
| Μεθυλιωμένη β-CD | 2,6 - 2,3,6 - | -O-CH ₃ |

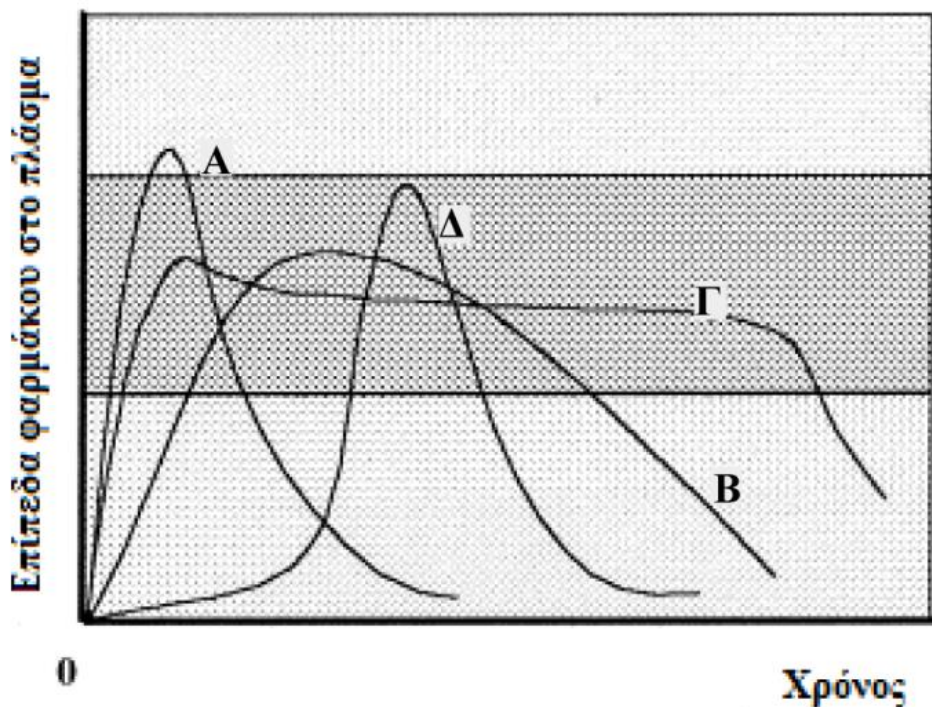
| | | |
|-----------------------------|---------------|---|
| Υδροξυαλκυλιωμένη β-CD | Τυχαίος | -O-CH ₂ -CH (OH)-CH ₃ |
| Διακλαδισμένη β-CD | 6 - | -Γλυκοζυλο-μαλτοζύλο |
| Υδρόφοβα παράγωγα | | |
| Αιθυλιωμένη β-CD | 2,6 - 2,3,6 - | -OC ₂ H ₅ |
| Υπερακυλιωμένη β-CD | 2,3,6 - | -O-CO(CH ₂) _n -OH ₃ |
| Ιοντιζόμενα παράγωγα | | |
| Καρβοξυαλκύλιο β-CD | Τυχαίος | -O-(CH ₂) _n -COONa |
| Καρβοξυμεθυλο αιθυλο | 2,6 - 3 - | -O-CH ₂ COONa-OC ₂ H ₅ |
| Θειικά | Τυχαίος | -O-SO ₃ Na |
| Αλκυλοσουλφονικά | Τυχαίος | -O-(CH ₂) _n -SO ₃ Na |

Οι μέχρι στιγμής αναφορές στη βιβλιογραφία δείχνουν ότι τα πολυλειτουργικά χαρακτηριστικά των β-CD επιτρέπουν τον ορθολογικό σχεδιασμό σύνθεσης καινοτόμων φαρμάκων και ότι ο συνδυασμός μοριακής ενθυλάκωσης με άλλα συστήματα φορέα θα γίνει μια πολύ αποτελεσματική και πολύτιμη μέθοδος για την ανάπτυξη νέων συστημάτων χορήγησης αυτών [73, 74]. Μεταξύ των χημικώς τροποποιημένων κυκλοδεξτρινών, οι υδρόφιλες [75, 76] ή αλλιώς ιοντιζόμενες [77-79] ενισχύουν την απορρόφηση του φαρμάκου, ενώ οι υδρόφοβες μπορεί να έχουν ευρεία εφαρμογή και θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως νέοι φορείς βραδείας αποδέσμευσης υδατοδιαλυτών φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών [80, 81]. Επιπλέον, η ιδιότητα της βιοαποικοδόμησης των CDs [82, 83] είναι ιδιαίτερα χρήσιμη και μπορεί να καταστήσει τις κυκλοδεξτρίνες φορείς φαρμάκων που στοχεύουν το παχύ έντερο και τα προφάρμακα μπορούν να χρησιμεύσουν ως τοποειδική πηγή παροχής φαρμάκων στον πρωκτό [84]. Επομένως, οι μητρικές και χημικώς τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες μπορούν να

χρησιμοποιηθούν ως φορείς επιθυμητής ποσότητας βιοδραστικών ουσιών σε θέσεις-στόχους.

1.5.1 Ελεγχόμενη χορήγηση βιοδραστικών ενώσεων από το στόμα

Το παρακάτω σχήμα (Σχήμα 5) δείχνει το τυπικό προφίλ του χρόνου απελευθέρωσης του φαρμάκου μετά από χορήγησή του από το στόμα. Τα συστήματα απελευθέρωσης μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες: σε αυτά που ελέγχουν το ποσοστό απελευθέρωσης της βιοδραστικής ουσίας και σ' εκείνα που ελέγχουν την ταχύτητα απελευθέρωσης αυτής (καθυστερημένου τύπου απελευθέρωσης). Ο τύπος ελεγχόμενης ταχύτητας ταξινομείται περαιτέρω σε τρεις τύπους, στην άμεση, παρατεταμένη και τροποποιημένη αποδέσμευση. Με βάση τα παραπάνω, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα παράγωγα κυκλοδεξτρινών προκειμένου να τροποποιήσουν την απελευθέρωση του φαρμάκου σε παρασκευάσματα που χορηγούνται από το στόμα (Πίνακας 4).



Σχήμα 5 Τυπικά προφίλ απελευθέρωσης φαρμάκου μετά από χορήγηση από το στόμα: (Α) Άμεση απελευθέρωση, (Β) Παρατεταμένη απελευθέρωση, (Γ) Τροποποιημένη απελευθέρωση, (Δ) Καθυστερημένη απελευθέρωση [85].

Πίνακας 4 Τροποποίηση του τύπου ελευθέρωσης του φαρμάκου ή/και του χρόνου από τις CDs [85].

| Πρότυπο απελευθέρωσης | Σκοπός | Είδος CD |
|--|---|---|
| Άμεση Απελευθέρωση | Ενισχυμένη διάλυση και απορρόφηση ανεπαρκώς υδατοδιαλυτών φαρμάκων | HP-β-CD, DM-β-CD, SB-β-CD, διακλαδισμένη β-CD |
| Παρατεταμένη αποδέσμευση | Παρατεταμένη απελευθέρωση των υδατοδιαλυτών φαρμάκων | Αιθυλιωμένη β-CD, ακυλιωμένες β-CD |
| Ελεγχόμενη αποδέσμευση | Πιο ισορροπημένη από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα με παρατεταμένα θεραπευτικά αποτελέσματα | Ταυτόχρονη χρήση διαφορετικών CDs ή/και άλλων εκδόχων |
| Καθυστερημένη απελευθέρωση (Εντερική) | | |
| Η αποδέσμευση εξαρτάται από το pH | Προστασία του φαρμάκου από το οξύ | CME-β-CD |
| Απελευθέρωση σε θέσεις στόχους | Στόχευση παχέος εντέρου | Σύμπλοκο φαρμάκου-CD |

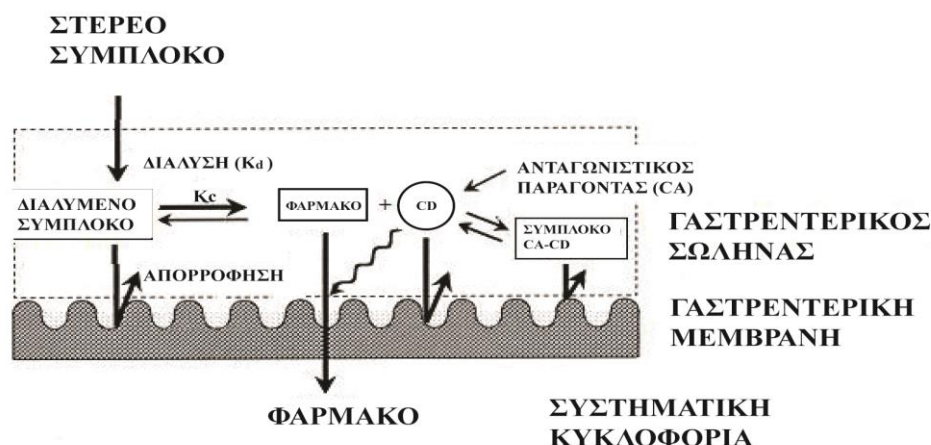
Οι υδρόφιλες CDs είναι χρήσιμες για τα συστήματα άμεσης αποδέσμευσης, ενώ οι υδρόφοβες για εκείνα της παρατεταμένης αποδέσμευσης. Στα συστήματα καθυστερημένης απελευθέρωσης χρησιμοποιείται η CME-β-CD (καρβόξυμεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη). Επιπλέον, ο συνδυασμός CD με άλλα υλικά φορέα είναι χρήσιμος για τη βελτιστοποίηση του ρυθμού αποδέσμευσης των φαρμάκων. Στη συνέχεια, θα περιγραφούν τυπικά παραδείγματα των εφαρμογών των παραγώγων CDs στα συστήματα τροποποιημένης και παρατεταμένης αποδέσμευσης.

1.5.2 Συστήματα άμεσης απελευθέρωσης (immediate release systems)

Τα συστήματα άμεσης αποδέσμευσης χρησιμοποιούνται για την άμεση απελευθέρωση βιοδραστικών ενώσεων, όπως τα αντιπυρετικά, αναλγητικά, αντιυπερτασικά και βρίσκουν εφαρμογές σε καταστάσεις έκτακτης ανάγκης. Στα συστήματα αυτά χρησιμοποιούνται οι υδρόφιλες κυκλοδεξτρίνες καθώς αυξάνουν τη διαλυτότητα, τον ρυθμό διαλυτοποίησης και τη διαβρεξιμότητα των βιοδραστικών μορίων με μικρή υδατοδιαλυτότητα μέσω του σχηματισμού συμπλόκων έγκλεισης, με αποτέλεσμα την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των μορίων αυτών. Υπάρχουν περισσότερα από δέκα προϊόντα που χορηγούνται από το στόμα και βασίζονται σε κυκλοδεξτρίνες [70].

Ο ρυθμός και η έκταση της από του στόματος βιοδιαθεσιμότητας ενός ελάχιστα υδατοδιαλυτού φαρμάκου από σύμπλοκο κυκλοδεξτρίνης μπορεί να βελτιστοποιηθεί με τη ρύθμιση διαφόρων φυσικοχημικών παραμέτρων [69]. Μόνο μια ελεύθερη μορφή του φαρμάκου, η οποία είναι σε ισορροπία με τη συμπλοκοποιημένη μορφή αυτού στο διάλυμα, είναι ικανή να διεισδύσει στα λιπόφιλα φράγματα που αποτελούνται είτε από επιθήλια του βλεννογόνου είτε από στρώματα κυττάρων και τελικά να εισέλθει στη συστηματική κυκλοφορία. Γενικά, η μέγιστη απορρόφηση επιτυγχάνεται όταν χρησιμοποιείται ακριβώς η απαραίτητη ποσότητα κυκλοδεξτρινών για να διαλυτοποιηθεί όλο το φάρμακο στο διάλυμα. Περαιτέρω προσθήκη CD στο διάλυμα του φαρμάκου μειώνει το ελεύθερο κλάσμα αυτού και, συνεπώς, μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητά του. Πρακτικές τυποποιήσεις συνήθως περιέχουν μεγάλη ποσότητα φαρμακευτικών εκδόχων, τα οποία μπορεί να ανταγωνίζονται με τη βιοδραστική ουσία για τη θέση στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης. Αυτός ο ανταγωνισμός μπορεί επίσης

να συμβεί με ενδογενείς ουσίες που υπάρχουν στο σημείο απορρόφησης. Η μετατόπιση του φαρμάκου από την κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης από εξωγενείς και ενδογενείς ουσίες στο σημείο αυτό είναι υπεύθυνη για την επιτάχυνση της απορρόφησης του [86, 87]. Για παράδειγμα, η συνολική διαδικασία της απορρόφησης του φαρμάκου από ένα στερεό σύμπλοκο παρουσία ανταγωνιστικού παράγοντα δείχνεται στο Σχήμα 6, όπου K_d είναι η σταθερά ρυθμού διάλυσης, η K_c προσδιορίζει τη σταθερότητα του συμπλόκου φαρμάκου-κυκλοδεξτρίνης, η K_i προσδιορίζει τη σταθερότητα του συμπλόκου ανταγωνιστικού παράγοντα-CD και η k_a είναι η σταθερά ρυθμού απορρόφησης του φαρμάκου. Ένας υψηλός ρυθμός διάλυσης και σχετικά σταθερά σύμπλοκα ($K_i > K_c$) ευνοούν το ελεύθερο φάρμακο που είναι άμεσα διαθέσιμο για απορρόφηση. Αντίθετα, μια ελεύθερη CD, μετά τη διάσπαση του συμπλόκου απομακρύνει ορισμένα συστατικά από την επιφάνεια της μεμβράνης, τροποποιώντας έτσι τις ιδιότητες μεταφοράς της και τη διευκόλυνση της απορρόφησης των φαρμάκων, κυρίως των υδατοδιαλυτών. Γι' αυτό θα πρέπει να παρατηρούμε και την κατεύθυνση διάσπασης της ισορροπίας των συμπλόκων αλλά και τη στοιχειομετρία τους ανάμεσα στα φαρμακευτικά σκευάσματα και τα σωματικά υγρά. Όπως δείχνεται στο σχήμα 6, οι κυκλοδεξτρίνες λειτουργούν μόνο ως υλικά φορείς για να βοηθήσουν να μεταφερθεί το φάρμακο μέσα από ένα υδατικό μέσο στη λιπόφιλη επιφάνεια απορρόφησης και τελικά στις γαστρεντερικές οδούς.



Σχήμα 6. Συνολική διαδικασία της απορρόφησης του φαρμάκου από ένα σύμπλοκο εγκλεισμού με ακόλουθη διάλυση και διάσπαση στον γαστρεντερικό σωλήνα [85].

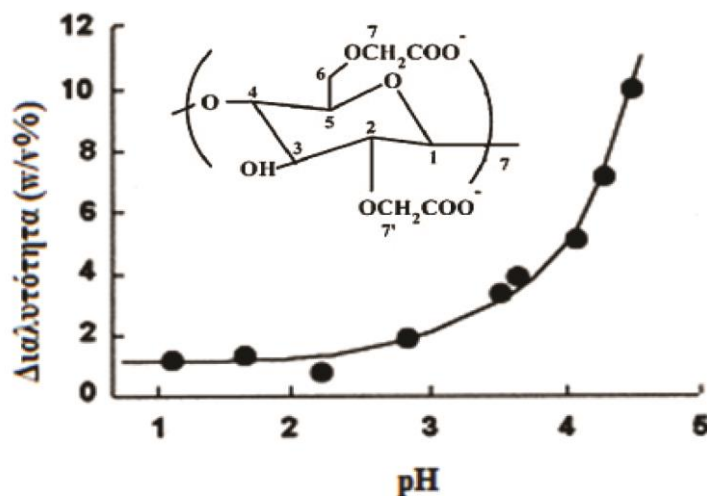
Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η συμπλοκοποίηση της β -CD με ιμιδαζολικούς αντιμυκητιασικούς παράγοντες, όπως η κετοконаζόλη και η εκοναζόλη παρέχει ένα πλεονέκτημα στη βιοδιαθεσιμότητα παρασκευασμάτων που χορηγούνται από το στόμα [88, 89]. Η σταθεροποιητική επίδραση των CDs είναι επίσης υπεύθυνη για τη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας των φαρμάκων που λαμβάνονται *per os*. Για παράδειγμα, ένα σύμπλοκο β -CD βρέθηκε να μειώνει την όξινη υδρόλυση των καρδιακών γλυκοζιδίων και συνεπώς την απορρόφηση της διγοξίνης σε σκύλους [90].

Πρόσφατα, πολύ υδρόφιλα παράγωγα των CDs, όπως HP- β -CD [91], μαλτοζυλο- β -CD (G2- β -CD) [92], και σουλφοβουτυλαιθερο- β -CD (SBE- β -CD) [93] έχουν χρησιμοποιηθεί για να ληφθεί ένα σκεύασμα άμεσης απελευθέρωσης που διαλύεται εύκολα στον γαστρεντερικό σωλήνα, ενισχύοντας την από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα των μικρής υδατοδιαλυτότητας φαρμάκων. Η HP- β -CD χρησιμοποιείται για να τροποποιήσει τις φυσικές ιδιότητες των φαρμάκων σε στερεή κατάσταση, όπως το μέγεθος των σωματιδίων, την πολυμορφική διαμόρφωση και τη μετατροπή από κρυσταλλική σε άμορφη ή υαλώδη κατάσταση [94, 95]. Ταχέως διαλυόμενα σύμπλοκα φαρμάκων με υδρόφιλες κυκλοδεξτρίνες είναι κατάλληλα για υπογλώσσια ή στοματική χορήγηση. Αυτό το είδος της εισόδου του φαρμάκου δεν δίνει μόνο μια ταχεία αύξηση στις συστηματικές συγκεντρώσεις του, αλλά και αποφεύγει τον μεταβολισμό του στο έντερο και στο ήπαρ. Ελήφθησαν όμως και άλλα σημαντικά αποτελέσματα για την υπογλώσσια χορήγηση δισκίων που περιέχουν σύμπλοκα στεροειδών-CD [96-101]. Τα σύμπλοκα πολυμερών με HP- β -CD και β -CD χρησιμοποιούνται για την απορρόφηση της τεστοστερόνης από τη στοματική κοιλότητα και όχι από τη γαστρεντερική οδό. Αυτοί οι διαλυτοποιητές δεν προκαλούν καμία βλάβη στους στοματικούς ιστούς [102]. Εγγενώς, το επίπεδο της ενδογενούς τεστοστερόνης στο αίμα αυξάνεται μερικές φορές την ημέρα κατά ώσεις που διαρκούν περίπου μια ώρα. Αυτή την παλμική απελευθέρωση της τεστοστερόνης μπορεί να μιμηθεί η υπογλώσσια χορήγηση του συμπλόκου HP- β -CD δίνοντας τα επιθυμητά φαρμακολογικά αποτελέσματα. Αυτό το παρασκεύασμα μπορεί να είναι κατάλληλο για αγωγή αγοριών με καθυστερημένη εφηβεία, καθώς και για ηλικιωμένους άντρες με ανεπάρκεια ανδρογόνων [100].

Μία άλλη προσέγγιση είναι η χρήση των αμφίφιλων κυκλοδεξτρινών, όπως η β- ή γ-CD, εστεροποιημένες στις δευτεροταγείς υδροξυλομάδες με αλυσίδες αλκυλίου (από C6 μέχρι C14). Αυτές είναι ικανές να σχηματίζουν αυτο-συναρμολογούμενες νανόσφαιρες που μπορούν να προστεθούν με υψηλές ποσότητες λιγότερο υδατοδιαλυτών φαρμάκων, όπως ινδομεθακίνη και προγεστερόνη. Το φάρμακο που είναι μοριακά διεσπαρμένο σε νανόσφαιρες απελευθερώνεται πολύ γρήγορα εντός υδατικού μέσου και επιτρέπει τη χορήγηση λιγότερο υδατοδιαλυτών φαρμάκων, που μπορεί να είναι ταχέως βιοδιαθέσιμα [103].

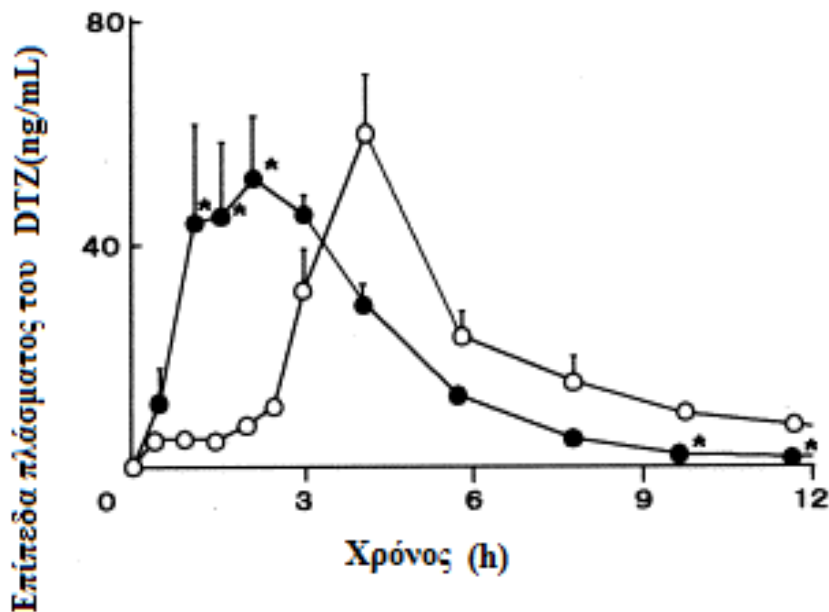
1.5.3 Συστήματα καθυστερημένης απελευθέρωσης (delayed release)

Ένα εντερικό παρασκεύασμα μπορεί να χαρακτηριστεί ως σύστημα χρονικά ελεγχόμενης αποδέσμευσης, εφόσον το φάρμακο απελευθερώνεται κατά προτίμηση στην εντερική οδό. Υδροφοβα έκδοχα που διαθέτουν μια ασθενώς όξινη ομάδα είναι προτιμότερα, επειδή είναι λιγότερο διαλυτά στο νερό σε χαμηλό pH, αλλά διαλυτά σε ουδέτερες και αλκαλικές περιοχές εξαιτίας του ιοντισμού της όξινης ομάδας. Τα συστήματα αυτά δεν αποδεσμεύουν τη βιοδραστική ουσία στο όξινο pH του στομάχου, αλλά στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου όπου το pH αυξάνεται. Κυρίως χρησιμοποιείται η CME-β-CD (καρβοξυμέθυλο-β-CD) η οποία παρουσιάζει μειωμένη διαλυτότητα του συμπλόκου στο στομάχι και αύξηση της διαλυτότητας όσο αυξάνεται το pH (Σχήμα 7). [83]



Σχήμα 7 Διαλυτότητα της CME-β-CD, ως συνάρτηση του pH σε υδατικό διάλυμα στους 25 °C [83].

Τα σύμπλοκα CME-β-CD έχουν χρησιμοποιηθεί σε *in vivo* και *in vitro* μελέτες με διλτιαζέμη, έναν ανταγωνιστή των διαύλων ασβεστίου και μολσιδομίνη, ένα περιφερειακό αγγειοδιασταλτικό. Οι μελέτες της διλτιαζέμης (DTZ) διεξήχθησαν σε ελεγχόμενη γαστρική οξύτητα σκύλων που νήστευαν με το γαστρικό pH να ρυθμίζεται σε λιγότερο από 2 (ενδομυϊκά με τετραγαστρίνη) και μεγαλύτερο από 6 (ενδοφλέβια με ομεπραζόλη). Η απορρόφηση της διλτιαζέμης ήταν βραδύτερη σε υψηλή οξύτητα στομάχου ($t_{max} = 4,0 \pm 0,5$ ώρες) από ότι σε χαμηλή οξύτητα ($t_{max} = 2,3 \pm 0,2$ ώρες) (Σχήμα 8).



Σχήμα 8 Επίπεδα πλάσματος της διλτιαζέμης μετά την από του στόματος χορήγηση δισκίων που περιέχουν CME-β-CD σύμπλοκο (ισοδύναμο με διλτιαζέμη σε 30 mg) σε ελεγχόμενη γαστρική οξύτητα σκύλων ○, υψηλή γαστρική οξύτητα σκύλων, ●, χαμηλή γαστρική οξύτητα σκύλων. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο \pm ένα τυπικό σφάλμα των τεσσάρων σκύλων. *, $p < 0.05$ [104].

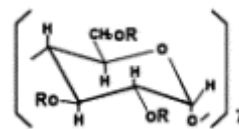
Τα δεδομένα απελευθέρωσης που μετρήθηκαν *in vitro* χρησιμοποιώντας μια συσκευή διάλυσης μεταβαλλόμενου pH συμφωνούσαν με τα δεδομένα *in vivo* [104]. Η απορρόφηση της μολσιδομίνης από δισκία που περιείχαν CME-β-CD μελετήθηκε σε ελεγχόμενη γαστρική οξύτητα σκύλων σε κατάσταση νηστείας και σε κατάσταση φυσιολογικής σίτισης. Υπό υψηλή γαστρική οξύτητα η απορρόφηση της ήταν σημαντικά καθυστερημένη σε σχέση με εκείνη που βρέθηκε υπό συνθήκες χαμηλής γαστρικής οξύτητας και μάλιστα αυτό το

φαινόμενο ήταν ακόμα πιο έντονο υπό συνθήκες νηστείας. Όπως και στις μελέτες με διλτιαζέμη σημειώθηκε ένας υψηλός βαθμός συσχέτισης μεταξύ των μελετών *in vivo* και εκείνων *in vitro* που μετρήθηκαν με συσκευή διάλυσης ευμετάβλητου pH [105].

1.5.4 Συστήματα παρατεταμένης απελευθέρωσης (prolonged release)

Στα συστήματα παρατεταμένης αποδέσμευσης χρησιμοποιούνται υδρόφοβες κυκλοδεξτρίνες, οι οποίες επιβραδύνουν το ρυθμό απελευθέρωσης των υδατοδιαλυτών βιοδραστικών ενώσεων από τα συστήματα χορήγησης. Στόχος των συστημάτων αυτών είναι η επίτευξη θεραπευτικών συγκεντρώσεων για μεγάλο χρονικό διάστημα ώστε να μειωθεί η συχνότητα χορήγησης των δόσεων του φαρμάκου. Στα συστήματα αυτά χρησιμοποιούνται κυρίως τα αλκυλιωμένα και ακετυλιωμένα παράγωγα των κυκλοδεξτρινών. Η DE-β-CD (diethyl-β-CD) και η TE-β-CD (triethyl-β-CD) ήταν οι πρώτοι φορείς βραδείας απελευθέρωσης που χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με τη διλτιαζέμη [106] και το δινιτρικό ισοσορβίδιο [107]. Οι αλκυλιωμένες CD με μέσο μήκος αλυσίδας (C4-C6), είναι ιδιαίτερα χρήσιμες ως νέοι υδρόφοβοι φορείς (πίνακας 5) λόγω των πολυλειτουργικών και βιολογικά ευπροσάρμοστων ιδιοτήτων τους [108].

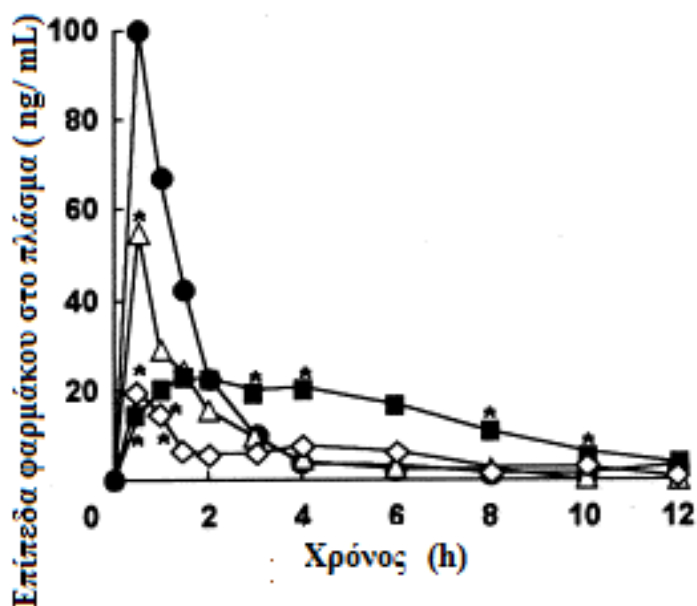
Πίνακας 5 Ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες της ακυλιωμένης β-CD α) Σε χλωροφόρμιο στους 25 °C, β) σε 80% (v/v) αιθανόλη-νερό στους 25 °C, γ) ελαιώδης ουσία, δ) στο νερό, ε) δεν μπορεί να προσδιοριστεί λόγω της χαμηλής διαλυτότητας [108].



| Χημική ένωση | R | Σημείο τήξης (°C) | [M] ^α | Διαλυτότητα ^β (mg/dl) |
|----------------------|---------------------------------|-------------------|-------------------|----------------------------------|
| β-CD | H | 280 | 1850 ^δ | 119.0 |
| TA- υπερακετυλο-β-CD | COCH ₃ | 201-202 | 2522 | 823.0 |
| TP- υπερπρόπυλο-β-CD | COC ₂ H ₅ | 168-169 | 2450 | 423.5 |
| TB-υπερβούτυλο-β-CD | COC ₃ H ₇ | 126-127 | 2607 | 219.8 |
| TV- υπερπέντυλο-β-CD | COC ₄ H ₉ | 54-56 | 2640 | 283.0 |

| Χημική ένωση | R | Σημείο τήξης (°C) | [M] ^α | Διαλυτότητα ^β (mg/dl) |
|----------------------|-----------------------------------|-------------------|------------------|----------------------------------|
| TH-υπερέξυλο-β-CD | COC ₅ H ₁₁ | - γ | 2620 | 3.7 |
| TO- υπερόκτυλο-β-CD | COC ₇ H ₁₅ | - γ | 2763 | - ε |
| TD-υπερδέκυλο-β-CD | COC ₉ H ₁₉ | - γ | 2668 | - ε |
| TL-υπερδωδέκυλο-β-CD | COC ₁₁ H ₂₃ | - γ | 2829 | - ε |

Βρίσκουν ευρεία εφαρμογή σε διάφορες οδούς χορήγησης: για παράδειγμα η βιοσυγκολλητική ιδιότητα της TB-β-CD μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνθέσεις που χορηγούνται από το στόμα ή διαβλεννογονικά, ενώ η ιδιότητα σχηματισμού μεμβράνης της TV-β-CD είναι χρήσιμη σε παρασκευάσματα που χορηγούνται διαδερμικά [109]. Σε στοματικές εφαρμογές, η μολσιδομίνη χρησιμοποιήθηκε για να σχεδιαστεί ένα παρασκεύασμα παρατεταμένης απελευθέρωσης, επειδή αυτό το φάρμακο είναι υδατοδιαλυτό και παρουσιάζει σύντομη βιολογική ημιζωή. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο ρυθμός απελευθέρωσης της μολσιδομίνης επιβραδύνεται έπειτα από συμπλοκοποίηση με υπεραλκυλιωμένες β-CDs όσο ελαττώνεται η διαλυτότητα [110]. Όταν τα σύμπλοκα χορηγήθηκαν σε σκύλους είδους μπίγκλ (beagle) από το στόμα, η TB-β-CD ελάττωσε τη μέγιστη συγκέντρωση της μολσιδομίνης στο πλάσμα και το φάρμακο διατηρήθηκε σε ένα επαρκές επίπεδο για μεγάλες χρονικές περιόδους, ενώ η χρήση άλλων παραγώγων που έχουν μικρότερες ή μακρύτερες αλυσίδες δεν έδιναν το επιθυμητό προφίλ (Σχήμα 9). Παράλληλα, παρατηρήθηκε στο πλάσμα παρατεταμένη διατήρηση (τουλάχιστον 24 ώρες) σε υψηλά και σταθερά επίπεδα σαλβουταμόλης (ενός βρογχοδιασταλτικού) ύστερα από χορήγηση μέσω του στόματος του συμπλόκου της TB-β-CD σε σκύλους. Το επίπεδο του κύριου μεταβολίτη, γλυκορουνίδιο της σαλβουταμόλης, ήταν σημαντικά χαμηλότερο από αυτό που βρέθηκε όταν το φάρμακο χορηγήθηκε μόνο του. Αυτό δείχνει ότι η TB-β-CD μπορεί να είναι άλλος ένας χρήσιμος φορέας υδατοδιαλυτών φαρμάκων που χορηγούνται από το στόμα και ειδικά εκείνων που μεταβολίζονται στη γαστραντερική οδό [111].



Σχήμα 9 Επίπεδα μοξιδομίνης στο πλάσμα μετά την από του στόματος χορήγηση καψουλών που περιέχουν μοξιδομίνη ή υπερακυλιωμένα σύμπλοκα β-CD (ισοδύναμο με 10 mg μοξιδομίνης) σε σκύλους. *, το φάρμακο μόνο του, △, σύμπλοκο TA-β-CD, ■, σύμπλοκο TB-β-CD, ◇, σύμπλοκο TH-β-CD. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ± τυπικό σφάλμα τριών-έξι σκύλων. *, $p < 0.05$ έναντι του φαρμάκου που χορηγείται σε μη συμπλοκοποιημένη μορφή [111].

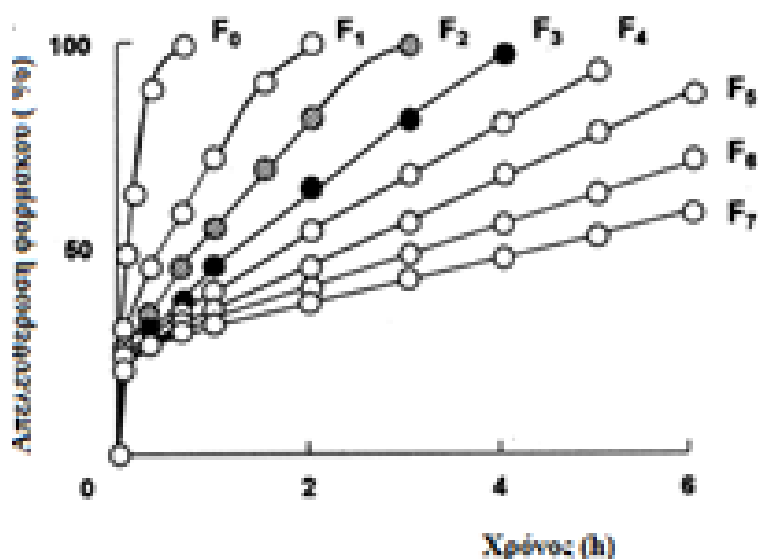
Η ανώτερη δράση της TB-β-CD μπορεί να είναι αποτέλεσμα τόσο της υδροφοβικότητάς όσο και των βλεννοσυγκολλητικών της ιδιοτήτων. Ομοίως, οι νανοσφαίρες που σχηματίζονται από αμφίφιλες CD, όπως η TH-β-CD, μπορεί να παρουσιάζουν βιοσυγκολλητικά αποτελέσματα στο γαστρεντερικό βλεννογόνο [103].

Η συνδυασμένη χρήση των κοντών και μακριών αλυσίδων υπερακυλιωμένων β-CD σε κατάλληλη μοριακή αναλογία είναι επίσης αποτελεσματική στον έλεγχο του ρυθμού απελευθέρωσης των υδατοδιαλυτών φαρμάκων [89].

1.5.5 Συστήματα τροποποιημένης αποδέσμευσης

Η συμβατική σύνθεση της νιφετιδίνης, ενός τυπικού ανταγωνιστή διαύλων ασβεστίου, πρέπει να χορηγείται δύο ή τρεις φορές ημερησίως λόγω της μικρής ημίσειας ζωής, που οφείλεται στον σημαντικό μεταβολισμό πρώτης διόδου. Επιπλέον, παρουσιάζει ορισμένα φαρμακευτικά προβλήματα, όπως χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα κατά τη χορήγηση από το στόμα, εξαιτίας της ελαττωμένης

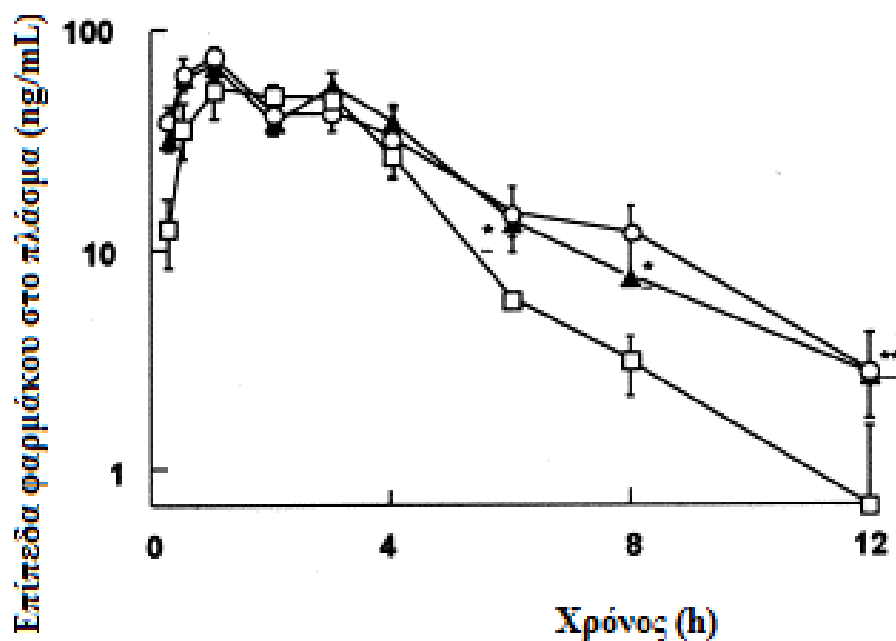
υδατοδιαλυτότητας, και μια μείωση στον ρυθμό διάλυσής της κατά την αποθήκευση (λόγω σχηματισμού κρυστάλλων) [112]. Επομένως, ο ρυθμός απελευθέρωσης της νιφετιδίνης πρέπει να τροποποιηθεί, ώστε να επιτευχθεί μια πιο ισορροπημένη βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου, όταν αυτό χορηγείται από το στόμα, που θα οδηγήσει σε μια παρατεταμένη θεραπευτική επίδραση. Ο Wang και οι συνεργάτες του [113-115] ανέπτυξαν πρόσφατα μια ταμπλέτα διπλής στιβάδας, χρησιμοποιώντας HP-β-CD και φαρμακευτικά έκδοχα και αξιολόγησε τη συμπεριφορά απελευθέρωσης του φαρμάκου. Σε αυτές τις μελέτες χρησιμοποιήθηκαν μια άμορφη σκόνη νιφετιδίνης, που παρασκευάστηκε με ψεκασμό με HP-β-CD, και ένα μη-ιοντικό καθαριστικό, HCO-60 (υδρογονωμένο καστορέλαιο), ως τμήμα ταχείας απελευθέρωσης, για την επίτευξη αρχικά γρήγορης διαλυτοποίησης και στη συνέχεια για την πρόληψη ανάπτυξης κρυστάλλων κατά την αποθήκευση.



Σχήμα 10 Προφίλ απελευθέρωσης της νιφετιδίνης (5 mg) από το απλό δισκίο (F0) και από επτά δισκία διπλής στρώσης (F1-F7) σε νερό στους 37 °C [114]. Η αναλογία των τμημάτων ταχείας-βραδείας αποδέσμευσης ακολουθεί την εξής σειρά F0 3:0, F1 3:1, F2 3:2, F3 3:3, F4 2:3, F5 1:3 και F6 0:3 [114].

Υδροξυλοπροπυλοκυτταρίνες (HPC) με διάφορους βαθμούς ιξώδους χρησιμοποιούνται ως τμήμα βραδείας απελευθέρωσης, ώστε να παρέχουν ένα κατάλληλο επίπεδο παρατεταμένης απελευθέρωσης της ελάχιστα υδατοδιαλυτής νιφετιδίνης από ιξώδεις μήτρες. Στη συνέχεια ερευνήθηκε μια βέλτιστη σύνθεση της ταμπλέτας διπλού στρώματος, αλλάζοντας την αναλογία ανάμιξης του τμήματος ταχείας και βραδείας αποδέσμευσης (Σχήμα 10).

Ο ρυθμός της *in vitro* απελευθέρωσης της νιφεδιπίνης από το δισκίο διπλής στιβάδας επηρεάστηκε ελάχιστα από το pH του φορέα και την ταχύτητα περιστροφής του περιστροφέα ακόμη και μετά από μακροχρόνια αποθήκευση υπό επιταχυνόμενες συνθήκες (60 °C, 75% σχετική υγρασία) [114]. Μεταξύ των επτά τυποποιήσεων που δοκιμάστηκαν, η ταμπλέτα διπλού στρώματος (F3), που αποτελείται από HP-β-CD με 3% HCO-60 υδροξυπροπυλοκυτταρίνη L (χαμηλού βαθμού ιξώδους)-υδροξυπροπυλοκυτταρίνη M (μεσαίου βαθμού ιξώδους) σε αναλογία βάρους 1/(1,5:1,5) επελέγη ως το πλέον κατάλληλο, επειδή προκάλεσε μια εξέχουσα επιβραδυντική επίδραση με μεγάλη βιοδιαθεσιμότητα, όταν χορηγήθηκε από το στόμα σε σύγκριση με εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα βραδείας αποδέσμευσης [115] (Σχήμα 11).



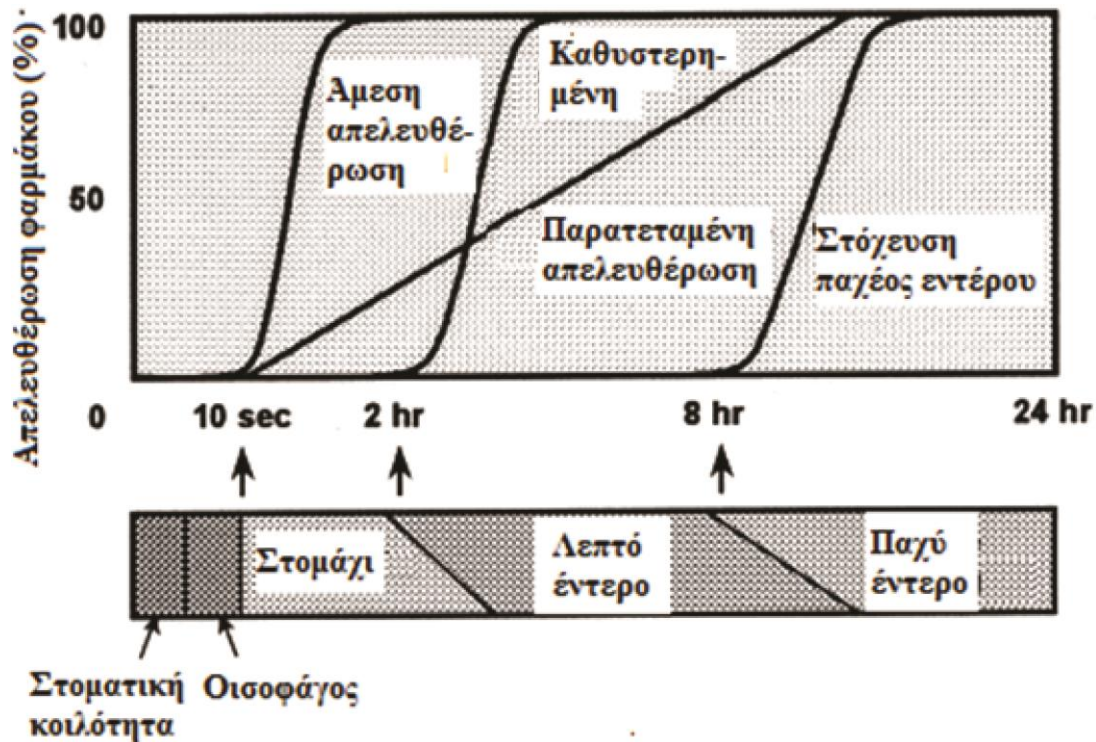
Σχήμα 11 Επίπεδα της νιφεδιπίνης μετά από του στόματος χορήγηση των δισκίων (20 mg, όπως νιφεδιπίνη) σε σκύλους. ○, δισκίο διπλής στρώσης (F 2) ▲, δισκίο διπλής στρώσης (F 3) □, Adalat L-20. Κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο ± τυπικό σφάλμα των τεσσάρων σκύλων [115].

Αυτά τα πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν ότι ένας συνδυασμός HP-β-CD και υδροξυπροπυλοκυτταρινών χρησιμεύει ως φορέας τροποποιημένης απελευθέρωσης της νιφεδιπίνης, και μπορεί να εφαρμοστεί και σε άλλα λιγότερο υδατοδιαλυτά φάρμακα με μικρή ημίσεια ζωής. Όταν το στομάχι είναι μια από τις

σημαντικές θέσεις απορρόφησης του φαρμάκου δεν πρέπει να καθυστερεί η απελευθέρωσή του. Αυτή η μορφή δοσολογίας απαιτείται για κάποια διουρητικά όπως η φουροσεμίδη και η πιρετανίδη, στα οποία η αποδέσμευση μιας ορισμένης ποσότητας του φαρμάκου στο στομάχι είναι επιθυμητή για να επιτευχθεί μια πιο ισορροπημένη βιοδιαθεσιμότητα. Για την πραγματοποίηση αποτελεσματικής βιοδιαθεσιμότητας για τέτοια όξινα φάρμακα, ήταν επίσης χρήσιμη η δισκιοποίηση διπλού στρώματος, που έχει υδρόφιλες CDs ως τμήμα ταχείας αποδέσμευσης και υδρόφοβες CDs ως τμήμα βραδείας αποδέσμευσης [116]. Στην περίπτωση της πιρετανίδης ένα δισκίο που αποτελείται από ένα σύστημα (DM-β-CD/υδροξυπροπυλοκυτταρίνη/αιθυλοκυτταρίνη) σε αναλογία βάρους 1/3 (1 μέρος DM-β-CD και 3 μέρη από τις τροποποιημένες κυτταρίνες) παρέχει επαρκή βραδεία απελευθέρωση του φαρμάκου επί 8 ώρες και μάλιστα σε μια ευρεία περιοχή pH μετά την αρχική του ταχεία διάλυση.

Λιγότερο υδατοδιαλυτά φάρμακα επιδεικνύουν συχνά ακανόνιστη βιοδιαθεσιμότητα όταν χορηγούνται από το στόμα, φαινόμενο που επιδεινώνεται ακόμα περισσότερο όταν γίνονται προσπάθειες για την ανάπτυξη μορφών δοσολογίας ελεγχόμενης απελευθέρωσης. Ένα πορώδες, ελεγχόμενης οσμωτικής αντλίας, δισκίο (CPOP, controlled porosity osmotic rump) είναι επικαλυμμένο με μια ημι-διαπερατή μεμβράνη που περιέχει εκχυλίσμα, πορώδη υλικά. Η ιδέα αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τον Zetner και τους συνεργάτες του [117]. Αυτό το σύστημα είναι γενικά εφαρμόσιμο μόνο για πολύ υδατοδιαλυτά φάρμακα. Επειδή τα λιγότερο υδατοδιαλυτά φάρμακα διαλύονται αργά, γενικά δεν είναι δυνατόν να μεταφερθούν από τέτοιες συσκευές και τέτοια δισκία. Αυτό το πρόβλημα μπορεί να ξεπεραστεί με την προσθήκη (SBE)-β-CD (υπάρχουν περίπου επτά βαθμοί υποκατάστασης της ομάδας σουλφο-βούτυλο αιθέρα για τα υδροξύλια της β-CD και αυτές μπορούν να λειτουργήσουν τόσο ως διαλυτοποιητές όσο και ως οσμωτικοί παράγοντες) [118]. Μεταγενέστερα, ο Okimoto και οι συνεργάτες του [119] ανέπτυξαν ένα νέο CPOP για την πρεδνιζολόνη χρησιμοποιώντας (SBE)-β-CD, η οποία δρα ως διαλυτοποιητής, και έναν οσμωτικό παράγοντα. Τα δισκία που περιέχουν εσωτερικό τμήμα σε ένα CPOP, που περιέχει φάρμακο και οσμωτικούς παράγοντες, ήταν επικαλυμμένα με λεπτό υμένιο οξικής κυτταρίνης. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν *in vitro* αποκάλυψαν ότι η πρεδνιζολόνη απελευθερώθηκε

πλήρως από τα CPOPs με (SBE)- β -CD, σε αντίθεση με τα σάκχαρα και με εκείνα που περιείχαν HP- β -CD. Αυτή η τεχνική έχει επίσης εφαρμοστεί στη χλωροπρομαζίνη [120], ένα ασθενώς βασικό φάρμακο, το οποίο εμφανίζει εξαρτώμενη από το pH διαλυτότητα και είναι ελάχιστα διαλυτό σε ουδέτερο pH.



Σχήμα 12 Προφίλ απελευθέρωσης του φαρμάκου μετά από του στόματος χορήγηση [120].

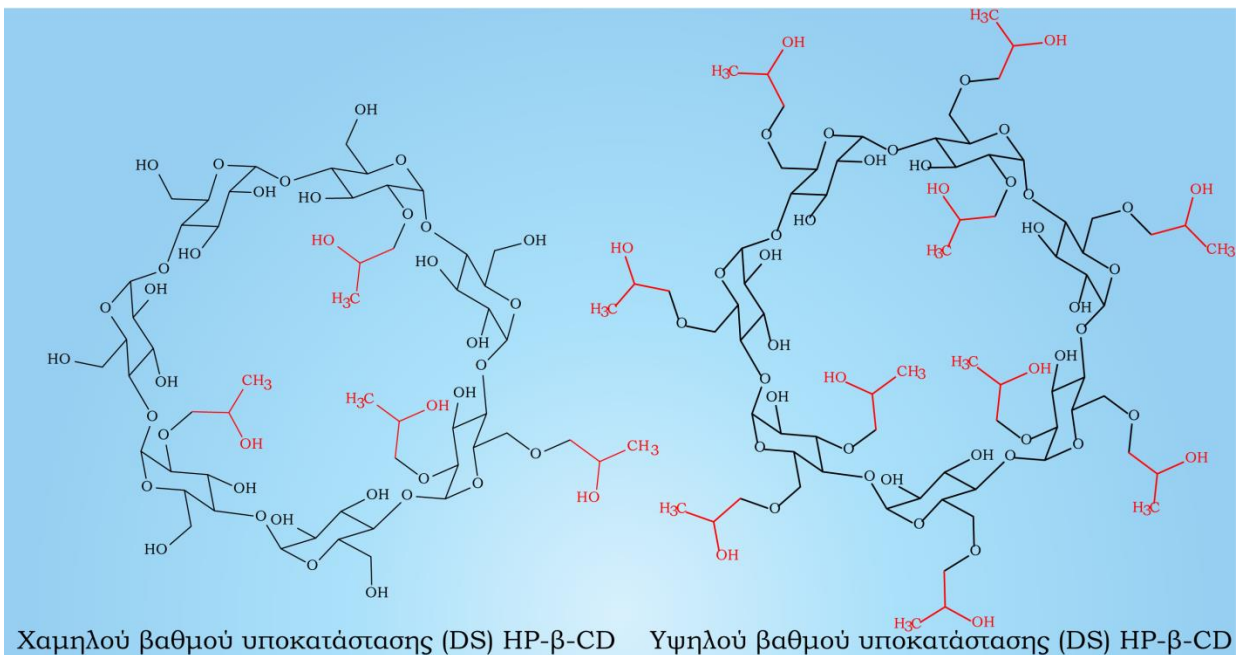
Η αλλαγή στον ρυθμό απελευθέρωσης του φαρμάκου από τους υδρόφοβους μεταφορείς, σαφώς και αντανακλάται στα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα των σκύλων μετά τη χορήγηση δισκίων από το στόμα (Σχήμα 12). Μολονότι η TA- β -CD του συστήματος, σε γραμμομοριακή αναλογία 1:2, διατήρησε τα επίπεδα του φαρμάκου στο πλάσμα άνω των 30 ng/mL για τουλάχιστον 24 ώρες, ένας συνδυασμός TA- β -CD και TO- β -CD έδωσε ένα σταθερό επίπεδο του φαρμάκου στο πλάσμα (20-40 ng/mL) για περισσότερο από 48 ώρες, με μια σημαντική αύξηση στην έκταση της βιοδιαθεσιμότητας.

Η δέσμευση των ενώσεων που εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή με την HP- β -CD είναι φαρμακοτεχνικά επιθυμητή. Η σύμπλεξη τους μπορεί να αυξήσει την απαγορευτική διαλυτότητα της καντεσαρτάνης και να βοηθήσει στην από του στόματος απορρόφηση των φυσικών προϊόντων προστατεύοντας τα από τις

μετατροπές στα εντερικά κύτταρα που μειώνουν την δράση τους όπως θα εξηγηθεί στο κεφάλαιο 4.

1.6 2-Υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD)

Στη σύγχρονη εποχή, η HP-β-CD (Σχήμα 13) αποτελεί τον πιο ευέλικτο διαθέσιμο κυκλικό ολιγοσακχαρίτη λόγω της δυνατότητας χρήσης της σε στοματικές, ορθικές, δερματικές, οφθαλμικές όπως και παρεντερικές φαρμακοτεχνικές μορφές, κυρίως με τη μορφή διαλυμάτων [121]. Εναλλάκτικα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί πλέον ως ενεργή φαρμακευτική ουσία. Ο Pitha υπέθεσε ότι το παρεντερικώς χορηγούμενο σύμπλοκο ενός δυσδιάλυτου φαρμάκου με HP-β-CD μετά την αποδέσμευση του φαρμάκου θα μπορούσε να έχει συμπληρωματική δράση μέσω της σύμπλεξης της ελεύθερης HP-β-CD με λιπόφιλα μόρια στο αίμα όπως βιταμίνες και ορμόνες [75]. Η ομάδα του δοκίμασε το 1987 ενδοφλέβια HP-β-CD για την αντιμετώπισης της υπερβιταμίνωσης (λόγω αδυναμίας μεταβολισμού της βιταμίνης A) [122]. Αυτή ήταν η πρώτη χρήση της HP-β-CD ως φάρμακο αντί για έκδοχο. Μεταξύ των προϊόντων με την HP-β-CD, τα πόσιμα και ενδοφλέβια διαλύματα της ιπρακοναζόλης (Sporanox, Janssen) παρουσιάζουν την πλέον διαδεδομένη χρήση [123].



Σχήμα 13 Παραδείγματα δομής της υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης (HP-β-CD) ανάλογα με τον βαθμό υποκατάστασης της.

Η ιτρακοναζόλη είναι ένα φάρμακο τύπου τριαζόλης που ασκεί τη δράση του μέσω της αναστολής του κυτοχρώματος P450 των μυκήτων, καθώς και της αναστολής της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης, ενός βασικού συστατικού της μυκητιστακής μεμβράνης. Η συγκεκριμένη ένωση ήταν ο πρώτος εγκεκριμένος πόσιμος παράγοντας που ήταν βιοδιαθέσιμος και παρουσίαζε σημαντική κλινική δράση κατά της *Candida spp* και του *Aspergillus spp*, δηλαδή των δύο περισσότερο διαδεδομένων παθογόνων μυκήτων για τον άνθρωπο [124-127]. Η ανάπτυξη σκευασμάτων για το συγκεκριμένο φάρμακο ήταν περίπλοκη λόγω των μη επιθυμητών φυσικοχημικών ιδιοτήτων, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται $pK_a=4$, $LOGP>5$ και υδατοδιαλυτότητα σε ουδέτερο pH που εκτιμάται σε 1 ng/ml [123, 128]. Η παραγωγή στερεών πόσιμων δοσολογικών μορφών έγινε τελικά εφικτή με τη χρησιμοποίηση τεχνολογίας στερεών διαλυμάτων στα οποία το φάρμακο και ένας πολυμερικός φορέας (υδροξυπροπυλομεθυλοκυτταρίνη (HPMC) ψεκάστηκαν σε αδρανείς σφαίρες σακχάρου για τον σχηματισμό μιας λεπτής μεμβράνης. Καθώς η μεμβράνη διαλύεται στο στομάχι, το μοριακά διαλυμένο φάρμακο απελευθερώνεται σε υπερκορεσμένα επίπεδα. Η συγχρόνως διαλυόμενη HPMC αναστέλλει την πυρήνωση και την κρυσταλλοποίηση, οπότε τα υπερκορεσμένα διαλύματα του φαρμάκου παραμένουν σταθερά για αρκετό διάστημα ώστε να επιτραπεί σημαντική απορρόφηση και από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα.

Δεδομένου ότι η ιτρακοναζόλη αποτελεί ασθενή βάση, το pH του στομάχου πρέπει να είναι επαρκώς χαμηλό ώστε να διασφαλίζεται ικανοποιητική διάλυση και ο σχηματισμός σταθερού διαλύματος [129]. Σε ορισμένους υποπληθυσμούς, το pH του στομάχου μπορεί να αποτελέσει περιοριστικό παράγοντα για τη βιοδιαθεσιμότητα. Οι ασθενείς με AIDS για παράδειγμα, συχνά υποφέρουν από υποχλωρυδρία, συνεπώς η θεραπεία ευκαιριακών μυκητιακών λοιμώξεων των συγκεκριμένων ασθενών με ιτρακοναζόλη μπορεί να αποβεί προβληματική [130]. Παρομοίως, οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες που χορηγούνται σε ασθενείς με καρκίνο μπορεί να μειώσουν τις γαστρεντερικές τους λειτουργίες, προκαλώντας βλεννογονίτιδα, ενώ τα άτομα που υποβάλλονται σε αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού των οστών μπορεί να εκδηλώσουν νόσο μοσχεύματος κατά του ξενιστή στο έντερο.

Τα πόσιμα και τα ενδοφλέβια σκευάσματα ιπρακοναζόλης με HP-β-CD που αναπτύχθηκαν αποδείχθηκαν ασφαλή και αποτελεσματικά σε πολυάριθμες κλινικές μελέτες. Αυτό οδήγησε στην είσοδό τους στις αγορές Ηνωμένων Πολιτειών και Ευρώπης (το πόσιμο διάλυμα το 1997 και το ενδοφλέβιο προϊόν το 1999) [131, 132]. Το πόσιμο προϊόν ενδείκνυται για την εμπειρική θεραπεία εμπύρετων ασθενών με υποψία μυκητιασικής λοίμωξης, καθώς και για τη θεραπεία στοματοφαρυγγικής και οισοφαγικής καντιντίασης. Το υδατικό (40% w/v) διάλυμα HP-β-CD περιέχει 10 mg/ml ιπρακοναζόλης, γεγονός που αντιπροσωπεύει αύξηση της φαινομενικής διαλυτότητας κατά πέντε ή έξι τάξεις μεγέθους. Η από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα της ιπρακοναζόλης είναι περισσότερο σταθερή στους υποπληθυσμούς των εμπύρετων ασθενών με υποψία μυκητιασικής λοίμωξης που περιγράφηκαν (απορροφούμενο κλάσμα 85% και από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα 55%) [133]. Με βάση μια από του στόματος δόση 200 mg ιπρακοναζόλης, η δόση της HP-β-CD είναι 8 g ημερησίως. Το ενδοφλέβιο προϊόν είναι επίσης εγκεκριμένο για εμπειρική θεραπεία καθώς και για βλαστομύκωση (πνευμονική και εξω-πνευμονική), ιστομύκωση (πνευμονική και διάχυτη, μη μηνιγγική) και ασπεργίλλωση (πνευμονική και μη πνευμονική), στην τελευταία περίπτωση σε άτομα που δεν ανταποκρίνονται ή δεν ανέχονται την αμφοτερικίνη B. Με βάση τις ενδοφλέβιες δόσεις ιπρακοναζόλης μεταξύ 200 και 400 mg και ένα σκεύασμα που περιέχει 10 mg ιπρακοναζόλης σε διάλυμα 40% HP-β-CD, η ενδοφλέβια δόση HP-β-CD κυμαίνεται μεταξύ 8 και 16 g ημερησίως.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή επιλέχθηκε η HP-β-CD για την πειραματική διαδικασία. Οι λόγοι επιλογής της είναι οι εξής:

- **Είναι μη τοξική**

Πολυάριθμες κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η HP-β-CD είναι αρκετά ανεκτή και ασφαλής στην πλειονότητα των ασθενών όταν η από του στόματος δόση είναι 4-8 g για 2 εβδομάδες [45]. Μεγαλύτερες δόσεις 16-24 g, όταν δόθηκαν για δύο εβδομάδες σε εθελοντές είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση των περιστατικών διάρροιας και για τον λόγο αυτό η ασφαλής ημερήσια δόση από το στόμα θεωρείται ότι είναι <16 g. Η ενδοφλέβια χορήγηση 3g και 1g την ημέρα επίσης είναι αρκετά ανεκτή και δεν εμφανίζει προβλήματα στα νεφρά [134].

- **Μπορεί να λειτουργήσει ως φάρμακο**

Τα τελευταία χρόνια αυξάνονται οι δημοσιεύσεις που συνδέουν την HP-β-CD με θεραπευτικές ιδιότητες. Έχει αποδειχθεί πως αναστέλλει την αντιγραφή και ελαττώνει την μεταδοτικότητα του ιού HIV *in vitro* και *in vivo*, ενώ ταυτόχρονα δρα ανοσορυθμιστικά μειώνοντας την φλεγμονώδη απόκριση η οποία συνήθως οδηγεί σε θανάτους σε άτομα προσβεβλημένα από HIV [135]. Επιπρόσθετα, αποδεικνύεται σημαντικό εργαλείο σταθεροποίησης της ανιάτης νευροεκφυλιστικής ασθένειας Niemann-Pick [136]. Οι ομοιότητες του σύνδρομου Niemann Pick και της νόσου Alzheimer οδήγησαν στη δοκιμή της HP-β-CD σε μοντέλα ποντικών με Alzheimer όπου η χωρική εκμάθηση και η απώλεια μνήμης βελτιώθηκαν σημαντικά και τα επίπεδα των β-αμυλοϊδών ελαττώθηκαν [137]. Οι αντιϊκές ιδιότητες της στους HIV, γρίπης H1N1 (influenza A) όπως και η αντιβακτηριδιακή δράση που εμφανίζει έναντι της *Vibrio cholerae* βασίζονται στη δυνατότητα της να συμπλέκει τη χοληστερίνη και με αυτό τον τρόπο να αποτρέπει την εξάπλωση των ιών και των βακτηρίων [138-141]. Πρόσφατα αποδείχτηκε και η δράση που έχει έναντι του καρκίνου, σε *in vivo* πειράματα που έγιναν σε λευχαιμικά ποντίκια [142]. Ο μηχανισμός πάλι σχετίζεται με τη ρύθμιση της ομοιοστάσης της χοληστερίνης η οποία οδηγεί στην αναστολή της αύξησης των λευχαιμικών κυττάρων. Τέλος, μπορεί να μειώσει τα οξειδωτικά παράγωγα (ROS) στο αίμα που δημιουργούν οι κρύσταλλοι χοληστερόλης [143].

- **Μπορεί να φιλοξενήσει υδρόφοβα φαρμακευτικά μόρια**

Η HP-β-CD μπορεί να δημιουργήσει υδρόφιλα σύμπλοκα πολύ υδρόφοβων ενώσεων όπως για παράδειγμα της προπιονικής τεστοστερόνης [144] και της τετραϋδροκανναβινόλης (THC) [145].

Τα πλεονεκτήματα αυτά την καθιστούν κατάλληλο όχημα μεταφοράς ενώσεων με φαρμακευτικό ενδιαφέρον, είτε για την αύξηση της δράσης τους ή για την μείωση των προβλημάτων που παρουσιάζουν.

Βασικό μειονέκτημα της είναι ότι αποτελεί μίγμα διαφορετικών υποκαταστάσεων το οποίο σημαίνει πως εμφανίζει πολυπλοκότητα στη βιολογική δράση καθώς και στην ερμηνεία της ανάλυσης των ερευνητικών αποτελεσμάτων.

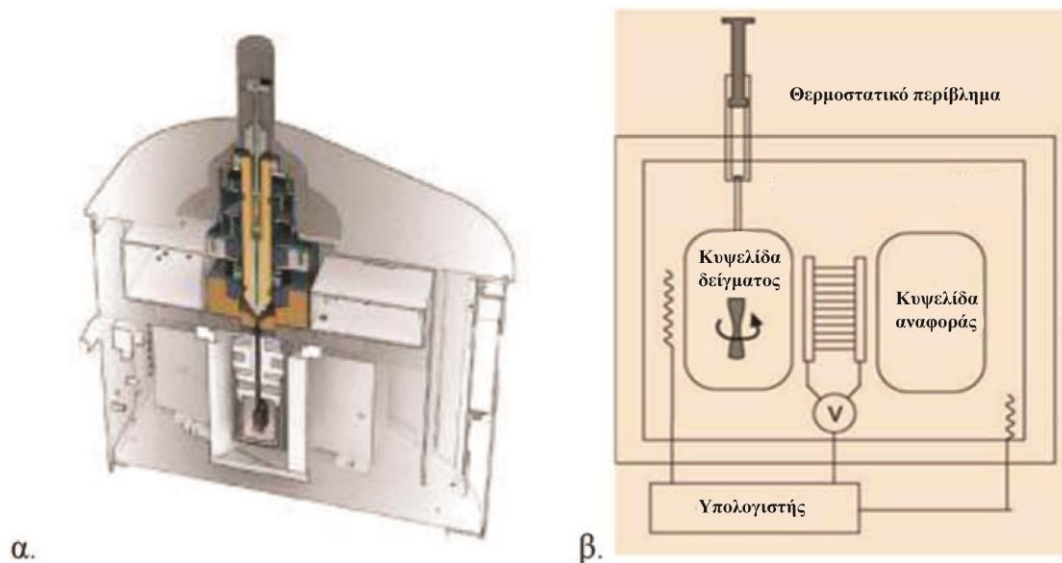
1.7 Τεχνικές ανάλυσης των συμπλόκων φαρμάκου κυκλοδεξτρίνης

Στη παρούσα διατριβή έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες τεχνικές για να επιβεβαιωθεί ο σχηματισμός και οι μοριακές ιδιότητες των συμπλόκων της κυκλοδεξτρίνης. Τα σύμπλοκα κυκλοδεξτρίνης-φαρμάκου μπορούν να χαρακτηριστούν σε στερεά κατάσταση ή σε διάλυμα. Η επιλογή της καταλληλότερης τεχνικής για χρήση εξαρτάται από τη διαδικασία συμπλοκοποίησης καθώς και από τις εγγενείς ιδιότητες του φαρμάκου, το μόριο κυκλοδεξτρίνης και το προκύπτον σύμπλοκο τους. Το φυσικό μίγμα των πρώτων υλών (φάρμακο και κυκλοδεξτρίνη) πρέπει να χαρακτηριστεί ταυτόχρονα προκειμένου να επιβεβαιωθεί η συμπλοκοποίηση.

1.7.1 Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC)

Η θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC) είναι μια θερμοδυναμική τεχνική για την παρακολούθηση οποιασδήποτε χημικής αντίδρασης ή ισορροπίας που εμπεριέχει πρόσδεση. Αποτελεί τη μέθοδο επιλογής για τον χαρακτηρισμό των βιομοριακών αλληλεπιδράσεων. Πρόσφατες αναβαθμίσεις στα όργανα μέτρησης της θερμιδομετρίας, επιτρέπουν την ανίχνευση πολύ ασθενών αλληλεπιδράσεων που περιλαμβάνουν χαμηλά ποσά θερμότητας της τάξης των μικροθερμίδων, καθιστώντας την κατάλληλη για την εξεύρεση των ασθενέστερων αλληλεπιδράσεων που σχετίζονται με τη συμπλοκοποίηση των κυκλοδεξτρινών [146].

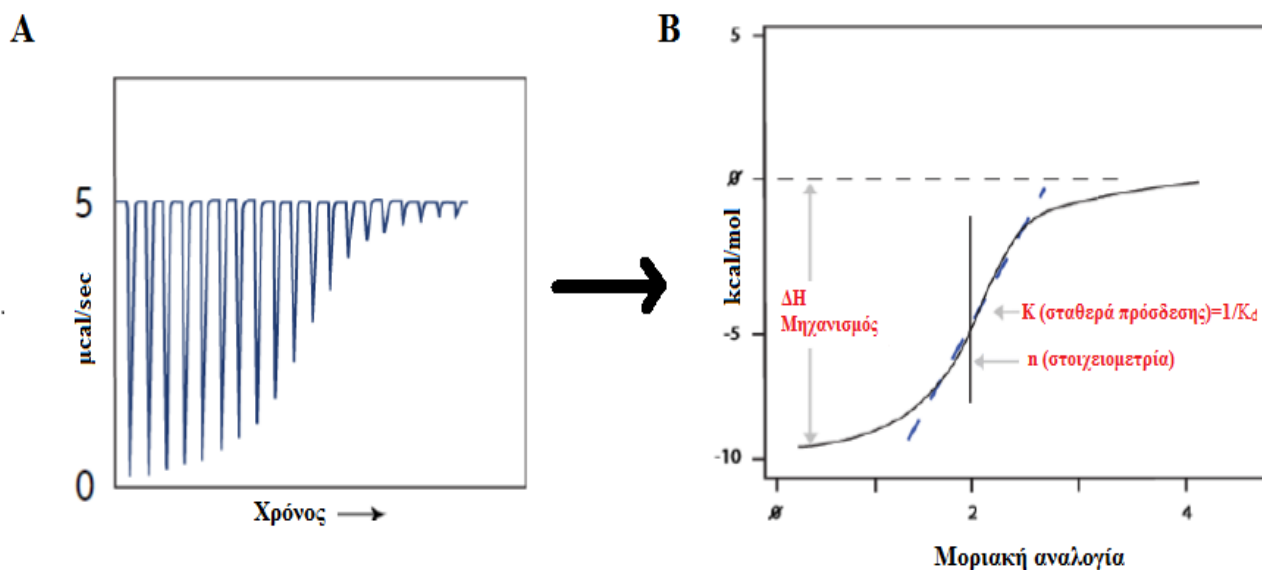
Η συσκευή ITC (Σχήμα 14) αποτελείται από 2 πανομοιότυπες κυψελίδες, μια κυψελίδα δείγματος και μια κυψελίδα αναφοράς, ενώ γύρω τους υπάρχει ένα θερμοστατικό περίβλημα. Η κυψελίδα αναφοράς θερμαίνεται με σταθερή ενέργεια και έπειτα τιτλοδοτείται το διάλυμα που υπάρχει στην κυψελίδα δείγματος με σταθερές ποσότητες διαλύματος.



Σχήμα 14 α. Κάθετη διατομή συσκευής ITC, β. Εσωτερική διάταξη της συσκευής [147].

Κατά αυτόν τον τρόπο, γίνεται δυνατή η μέτρηση της θερμότητας που εκλύεται (ή προσλαμβάνεται) και αρα ο υπολογισμός της σταθεράς πρόσδεσης K_a , των μεταβολών ενθαλπίας ΔH καθώς και της στοιχειομετρίας της αντίδρασης.

Κατά τη διαδικασία του πειράματος εξάγονται ισόθερμες κορυφές (Σχήμα 15). Οι ισόθερμες κορυφές αυτές αναλύονται σε σιγμοειδή καμπύλη όπου μετράται η παραγωγή θερμότητας σε σχέση με την μοριακή αναλογία βιοδραστικής ένωσης και κυκλοδεξτρίνης. Χρησιμοποιώντας πολυωνυμικές συναρτήσεις και συγκρίνοντας τις με την καμπύλη μπορεί να εξαχθεί από την κάθετο στην μέση της καμπύλης το K_d . Ταυτόχρονα υπολογίζοντας τη διαφορά της αρχικής θέσης στον άξονα της θερμότητας με την τελική εξάγεται το ΔH .



Σχήμα 15 Μεθοδολογία εξαγωγής βασικών θερμοδυναμικών παραμέτρων στα σύμπλοκα των βιοδραστικών ενώσεων με HP-β-CD με τη χρήση της ITC.

Οι υπόλοιπες θερμοδυναμικές παράμετροι εξάγονται από τις παρακάτω εξισώσεις

$$\Delta G = RT \ln K_d \quad \text{Εξίσωση 1-1}$$

Και

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Εξίσωση 1-2}$$

1.7.2 Φασματοσκοπία NMR υγρής κατάστασης

Η φασματοσκοπία NMR αποτελεί μια αξιόπιστη λύση για τη δομική ταυτοποίηση οργανικών ενώσεων, ιδιαίτερα στην κατάσταση διαλύματος. Οι τεχνικές $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τις απλές κυκλοδεξτρίνες, αλλά αυξάνεται επίσης η χρήση τους για τη διευκρίνιση των περίπλοκων συνθετικών τροποποιήσεων της κυκλοδεξτρίνης με τις σύγχρονες διαθέσιμες μεθόδους. Συνήθως, συνθετικές μεταβολές στη κυκλοδεξτρίνη οδηγούν σε πολύ πιο περίπλοκα συστήματα spin σε σύγκριση με τα εξαιρετικά συμμετρικά των απλών κυκλοδεξτρίνων [148]. Η σύγκριση χημικών μετατοπίσεων (διαφορά μετατοπίσεων $\Delta\delta$) που υπάρχουν στις ελεύθερες δομές και στις συμπλεγμένες δείχνει ισχυρότερη ή ασθενέστερη προάσπιση των ατόμων. Με τον τρόπο αυτόν

μπορούμε να ελέγξουμε το περιβάλλον των φιλοξενούμενων ατόμων μεμονωμένα αποτιμώντας εάν αυτά βρίσκονται εντός ή εκτός της υδρόφοβης κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης. Ταυτόχρονα, η μετακίνηση των κορυφών σε υψηλότερο ή χαμηλότερο πεδίο σε σχέση με την αδέσμευτη κυκλοδεξτρίνη δείχνει την τάση συμπλοκοποίησης του μορίου. Τέλος σημαντικές πληροφορίες εξάγονται και από τη σύγκριση του πλάτους των κορυφών του συμπλόκου σε σχέση με τις μη συμπλοκοποιημένες όπου σημαντική διεύρυνση τους ισοδυναμεί με μείωση της κινητικότητας τους άρα και σύμπλεξη. Το αποτέλεσμα είναι να εξαχθούν πληροφορίες για τη δημιουργία της δομής του συμπλόκου δηλαδή του προσανατολισμού και του τοπογραφικού εντοπισμού που έχει το συμπλεγμένο φάρμακο εντός της κοιλότητας [149-152].

1.7.3 Φασματοσκοπία NMR στερεής κατάστασης (solid state NMR)

Ιστορικά, η λήψη φασμάτων NMR υψηλής διαχωριστικής ικανότητας ήταν εφικτή μόνο σε διαλύματα. Τα στερεά λόγω των απορροφήσεων μεγάλου εύρους παρουσίαζαν φάσματα τα οποία δεν ήταν δυνατό να ερμηνευτούν. Επομένως η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού περιοριζόταν σημαντικά, αφού πολλές ενώσεις είναι αδιάλυτες ή ελάχιστα διαλυτές σε νερό ή σε οργανικούς διαλύτες. Επίσης πολλές φορές η διάλυση των στερεών επιφέρει αλλαγές και επομένως δομικά χαρακτηριστικά της στερεάς κατάστασης δεν είναι δυνατό να παρατηρηθούν.

Σήμερα οι πληροφορίες που μπορούν να αντληθούν από φάσματα NMR στερεάς κατάστασης (υψηλής διακριτικής ικανότητας) είναι εξίσου σημαντικές με τις αντίστοιχες πληροφορίες που λαμβάνονται από φάσματα υγρής κατάστασης. Για να είναι εφικτό αυτό απαιτείται ειδικός εξοπλισμός ώστε να επιτευχθεί αποσύζευξη, καθώς και εφαρμογή διάφορων τεχνικών όπως για παράδειγμα της περιστροφής υπό μαγική γωνία (Magic Angle Spinning), την τεχνική της διασταυρούμενης πόλωσης (Cross polarization), ειδικοί αισθητήρες και ειδικά πειράματα δύο διαστάσεων [149].

Η συμβατική χρησιμοποίηση τεχνικών λήψης δεδομένων NMR φάσης διαλύματος σε στερεά δείγματα αποδίδει ευρεία φάσματα χωρίς χαρακτηριστικά. Η ευρεία φύση του σήματος οφείλεται πρωτίστως σε διπολικές αλληλεπιδράσεις οι οποίες δεν έχουν μέση τιμή στο μηδέν στη στερεά κατάσταση και στην

ανισοτροπία της χημικής μετατόπισης (CSA), η οποία και πάλι είναι συνάρτηση του γεγονότος ότι η ένωσή μας που ενδιαφέρει είναι σε στερεή κατάσταση.

1.7.3.1 Ανισοτροπία χημικής μετατόπισης

Η χημική μετατόπιση είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης ενός πυρήνα με το ηλεκτρονιακό περιβάλλον του και με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0 . Η χημική μετατόπιση ενός πυρήνα εξαρτάται και από τον προσανατολισμό του σε σχέση με το μαγνητικό πεδίο. Σ' ένα στερεό δείγμα οι δεσμοί των μορίων μπορούν να προσανατολισθούν σε διάφορες διευθύνσεις σχηματίζοντας έτσι διαφορετικές γωνίες με τη διεύθυνση του μαγνητικού πεδίου. Αυτό προκαλεί μεταβολή στη χημική μετατόπιση του παρατηρήσιμου πυρήνα. Το φαινόμενο αυτό καλείται χημική ανισοτροπία.

Στα υγρά δείγματα ο παράγοντας αυτός μηδενίζεται λόγω των ραγδαίων μεταβολών των προσανατολισμών που λαμβάνουν οι δεσμοί των παρατηρήσιμων πυρήνων.

Η τριδιάστατη μαγνητική προάσπιση από τα περιβάλλοντα ηλεκτρόνια είναι μια επιπρόσθετη αλληλεπίδραση που επηρεάζει τον πυρήνα είτε στο διάλυμα ή στη στερεά κατάσταση. Αυτή η χαμιλτονιανή της ανισοτροπίας χημικής μετατόπισης (H_{CSA}) σχετίζεται άμεσα με τις αλλαγές στο άμεσο περιβάλλον του πυρήνα και παρέχει τις περισσότερες διαγνωστικές πληροφορίες στο φάσμα NMR. Αυτές οι μικρές διαταραχές στον πυρήνα εκδηλώνονται σε μια αλλαγή στο μαγνητικό πεδίο που υφίσταται ο πυρήνας. Επομένως, το πεδίο στον πυρήνα δεν είναι ίσο με το εξωτερικά εφαρμοζόμενο πεδίο, συνεπώς η διαφορά είναι η πυρηνική προάσπιση ή η ανισοτροπία χημικής μετατόπισης Εξίσωση 1-4

$$H_{CS} = \gamma_I \hbar \vec{I} \cdot \hat{\sigma} \cdot \vec{B}_0$$

Εξίσωση 1-4

Ο προσανατολισμός της σταθεράς προάσπισης σ και το γεγονός ότι η προάσπιση είναι ανάλογη με το εφαρμοζόμενο πεδίο, οδηγεί στην ανάγκη για υλικά αναφοράς χημικής μετατόπισης όπως το τετραμεθυλοπυρίτιο. Τα φάσματα NMR υγρής κατάστασης αποδίδουν "μέσες" τιμές χημικής μετατόπισης οι οποίες είναι χαρακτηριστικές του μαγνητικού περιβάλλοντος για έναν συγκεκριμένο

πυρήνα. Το μέσο σήμα οφείλεται στην ιστροπική κίνηση των μορίων στο διάλυμα. Το B_0 "βλέπει" έναν μέσο προσανατολισμό ενός συγκεκριμένου πυρήνα. Για το NMR στερεάς κατάστασης, η τιμή χημικής μετατόπισης είναι επίσης χαρακτηριστική του μαγνητικού περιβάλλοντος ενός πυρήνα, αλλά τα μόρια δεν είναι ελεύθερα να μετακινούνται. Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η προάσπιση είναι χαρακτηριστική του πυρήνα σ' έναν συγκεκριμένο προσανατολισμό του μορίου σε σχέση με το B_0 . Επομένως, μια συγκεκριμένη λειτουργική ομάδα προσανατολισμένη κάθετα προς το μαγνητικό πεδίο θα δώσει ένα οξύ σήμα χαρακτηριστικό αυτού του συγκεκριμένου προσανατολισμού. Αν μια λειτουργική ομάδα είναι προσανατολισμένη παράλληλα με το B_0 , τότε θα παρατηρηθεί ένα χαρακτηριστικό οξύ σήμα λόγω αυτού του προσανατολισμού. Για τα περισσότερα πολυκρυσταλλικά φαρμακευτικά δείγματα, θα υπάρχει τυχαία κατανομή όλων των προσανατολισμών του μορίου. Η κατανομή αυτή εμπεριέχει όλους τους δυνατούς προσανατολισμούς και έτσι παρατηρείται ως πολύ ευρύ σήμα NMR. Το μέγεθος της ανισοτροπίας για τη χημική μετατόπιση είναι τυπικά μεταξύ 0 και 105 Hz

1.7.3.2 Αλληλεπίδραση διπόλου-διπόλου

Η αλληλεπίδραση διπόλου-διπόλου είναι η άμεση μαγνητική σύζευξη δύο πυρήνων. Αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να περιλαμβάνει δύο πυρήνες με ίδιο ή και διαφορετικό spin. Η συνολική αλληλεπίδραση, είναι το άθροισμα όλων των πιθανών αλληλεπιδράσεων στα πιθανά ζεύγη (ομο- και ετεροπυρηνικών). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η αλληλεπίδραση εξαρτάται από το μέγεθος των μαγνητικών ροπών που περιγράφεται από τον γυρομαγνητικό λόγο και τη γωνία (θ) που σχηματίζει ο πυρήνας με το B_0 . Επομένως, αυτή η αλληλεπίδραση είναι σημαντική για πυρήνες με spin 1/2 που παρουσιάζουν σημαντικές μαγνητικές ροπές όπως ^1H και ^{19}P . Επίσης, η αλληλεπίδραση μειώνεται ραγδαία με την αυξανόμενη διαπυρηνική απόσταση (r). Η εξίσωση 1-3 περιγράφει τη διπολική αλληλεπίδραση για ζεύγος με δύο διαφορετικά spin I και S [153].

$$H_D^{IS} = \frac{\gamma^I \gamma^S \hbar}{r^3} \vec{I} \cdot \vec{S}$$

Εξίσωση 1-3

Δεδομένου ότι ο διπολικός τανυστής σύζευξης, D , περιέχει έναν όρο $(1-3 \cos^2\theta)$, η αλληλεπίδραση εξαρτάται από τον προσανατολισμό του μορίου. Σε μελέτες φάσης διαλύματος όπου τα μόρια ταλαντεύονται γρήγορα, ο όρος $(1-3\cos^2\theta)$ ενσωματώνεται σε όλες τις γωνίες του θ και εξαλείφεται. Στον NMR στερεάς κατάστασης, τα μόρια είναι σταθερά σε σχέση με το B_0 , έτσι ο όρος $(1-3\cos^2\theta)$ δεν τείνει στο μηδέν [154]. Αυτό οδηγεί σε διπολική διεύρυνση εντός του φάσματος NMR στερεάς κατάστασης δεδομένου ότι οι αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου τυπικά κυμαίνονται από 0 έως 105 Hz. Στην περίπτωση των φαρμακευτικών στερεών που αποτελούνται κυρίως από πυρήνες άνθρακα και υδρογόνων, οι αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου μπορούν να απλοποιηθούν. Οι πυρήνες άνθρακα και πρωτονίων μπορούν να θεωρηθούν ως "σπάνιες" και "άφθονες" με βάση την ισοτοπική τους φυσική αφθονία, αντίστοιχα. Οι ομοπυρηνικές ^{13}C - ^{13}C διπολικές αλληλεπιδράσεις ουσιαστικά δεν υπάρχουν λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης πυρήνων ^{13}C (φυσική αφθονία 1,1%). Από την άλλη πλευρά, οι διπολικές αλληλεπιδράσεις ^1H - ^{13}C συμβάλλουν σημαντικά στη διπολική διεύρυνση, αλλά αυτή η ετεροπυρηνική αλληλεπίδραση μπορεί να απομακρυνθεί μέσω απλών πεδίων αποσύνδεσης πρωτονίων υψηλής ισχύος (high-power decoupling fields), παρόμοια με τις τεχνικές φάσης διαλύματος.

1.7.3.3 Συζεύξεις spin-spin και τετραπόλων

. Δύο πρόσθετες αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται από τον πυρήνα στην στερεά κατάσταση είναι οι συζεύξεις spin-spin και τετραπόλων, οι οποίες περιλαμβάνουν πυρήνες με spin μεγαλύτερο από 1/2. Η περιστροφή spin-spin, προέρχεται από την άμεση σύζευξη μεταξύ δύο spin μέσω του ηλεκτρονιακού περιβάλλοντός τους και είναι μερικές τάξεις μεγέθους μικρότερες (πιθανώς 0-104 Hz, συνήθως μόνο λίγα kHz) από τις αλληλεπιδράσεις διπόλων. Συνοψίζοντας τις αλληλεπιδράσεις, οι ισότροπες κινήσεις των μορίων στην κατάσταση διαλύματος, δίδουν μια διακριτή μέση τιμή για την αλληλεπίδραση σύζευξης spin-spin και τις αλληλεπιδράσεις χημικής μετατόπισης. Στον διπολικό όρο, ο μέσος όρος που λαμβάνεται είναι μηδέν και η αλληλεπίδραση δεν παρατηρείται σε μελέτες φάσης διαλύματος. Αντιθέτως, οι αλληλεπιδράσεις στη στερεά κατάσταση εξαρτώνται κυρίως από τον προσανατολισμό και παράγουν ένα πιο περίπλοκο φάσμα που περιέχει όμως πολύ περισσότερες πληροφορίες. Προκειμένου να παραχθούν "παρόμοια με της υγρής κατάστασης" φάσματα

στερεών, χρησιμοποιείται ένας συνδυασμός τριών τεχνικών: διπολική αποσύζευξη, περιστροφή δείγματος υπό μαγική γωνία [155, 156] και μεταφορά πόλωσης [157].

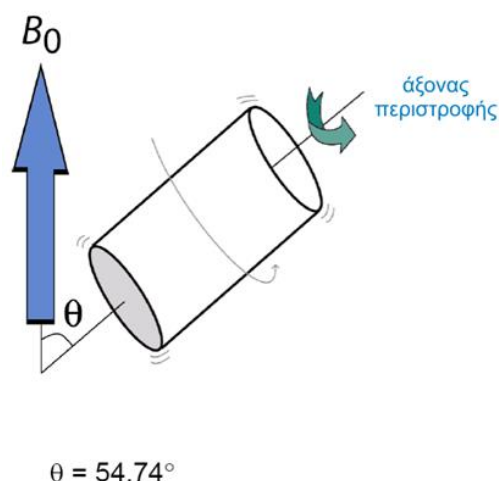
1.7.3.4 Διπολική αποσύζευξη

Σε στερεά δείγματα, για τους πυρήνες ^{13}C , οι ευρείς συντονισμοί παρατηρούνται λόγω των μεμονωμένων διπολικών συζεύξεων στα πρωτόνια και τους τυχαίους προσανατολισμούς των διανυσμάτων C-H ως προς το άνυσμα του μαγνητικού πεδίου. Η εφαρμογή υψηλής ισχύος για την αποσύζευξη των πρωτονίων μπορεί να απαλείψει τις διπολικές αλληλεπιδράσεις. Αυτό επιτυγχάνεται με την ακτινοβολία του δείγματος στη συχνότητα σύζευξης των πρωτονίων για να απαλείψει τα ορατά αποτελέσματα αυτών των αλληλεπιδράσεων στο φάσμα. Συνήθως απαιτούνται αποσυζευκτικά πεδία της τάξης των 60 kHz και η παραγωγή τους απαιτεί αντίστοιχα ισχύ άνω των 100 W. Έτσι, για τα παραπάνω χρειάζονται μεγάλοι ενισχυτές και συχνά παράγονται μη αμελητέα ποσά θερμότητας στο δείγμα [149].

Η σύζευξη ^{13}C - ^1H είναι αρκετά σημαντική στις οργανικές ενώσεις και δημιουργεί πολύπλοκα φάσματα, τα οποία δύσκολα ερμηνεύονται. Το φαινόμενο της σύζευξης ^{13}C - ^1H είναι ιδιαίτερα έντονο σε οργανικές ενώσεις με μεγάλο μοριακό βάρος, γι' αυτό εφαρμόζεται πάντοτε συστηματική αποσύζευξη πρωτονίων ή αποσύζευξη του θορύβου των πρωτονίων (proton noise decoupling), όπως συνήθως καλείται. Με τον τρόπο αυτό κάθε άνθρακας του μορίου της οργανικής ένωσης παρουσιάζει μία φασματική γραμμή .

1.7.3.5 Περιστροφή του δείγματος υπό μαγική γωνία (MAS-Magic Angle Spinning)

Η περιστροφή του δείγματος υπό μαγική γωνία (Σχήμα 16) ως προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο είναι η μόνη γνωστή τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε στερεά δείγματα, προκειμένου να εξαληφθεί η ανισοτροπία της χημικής μετατόπισης και να επιτευχθεί η ισοτροπική μετατόπιση που παρατηρείται στον Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό υγρής φάσης [149].



Σχήμα 16 Όταν το δείγμα περιστρέφεται υπό γωνία θ , σε σχέση με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, ίση με $\theta = 54,44'$ ($54,74^\circ$), τότε εξαλείφεται η ανισοτροπία χημικής μετατόπισης. Η μαγική γωνία είναι η γωνία που σχηματίζεται μεταξύ του z άξονα και της διαγωνίου του υποθετικού κύβου του παραπάνω σχήματος.

1.7.3.6 Μεταφορά πόλωσης (CP-Cross Polarization)

Η διπολική σύζευξη άνθρακα-13/πρωτονίου η οποία μειώνει τη διαχωριστικότητα των φασμάτων του άνθρακα-13 σε στερεή κατάσταση, παρέχει συγχρόνως τη δυνατότητα αύξησης της ευαισθησίας μέσω της τεχνικής διασταυρούμενης πόλωσης. Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιείται η μεγάλη μαγνήτιση του πρωτονίου για να πολώσει τους πυρήνες άνθρακα-13. Συγχρόνως, με τον τρόπο αυτό επιλύεται το πρόβλημα των μεγάλων χρόνων αποδιέγερσης των πυρήνων άνθρακα-13 γιατί οι χρόνοι αποδιέγερσης τους καθορίζονται από τους μικρούς χρόνους αποδιέγερσης των πρωτονίων. Το αποτέλεσμα είναι ότι ο πειραματικός χρόνος λήψης μειώνεται [158].

1.7.4 Μοριακή δυναμική

Η μοριακή δυναμική καλείται η προσομοίωση της εξαρτώμενης από τον χρόνο συμπεριφοράς ενός μοριακού συστήματος, όπως δονητική κίνηση ή κίνηση Brown [159]. Σ' αυτή χρησιμοποιείται τρόπος υπολογισμού της ενέργειας του συστήματος, που συνήθως είναι υπολογισμός μοριακής μηχανικής. Αυτή η ενεργειακή έκφραση χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των δυνάμεων επί των ατόμων για οποιαδήποτε δεδομένη γεωμετρία [160]. Το πρώτο βήμα σε κάθε προσομοίωση MD είναι η επιλογή των αρχικών θέσεων για τα άτομα. Το σύστημα θα πρέπει να είναι σε μια βελτιστοποιημένη γεωμετρία προκειμένου να

αποφεύγονται οι επικαλύψεις. Για τα διαλύματα με μια διαλυμένη ουσία, η διαλυμένη ουσία τοποθετείται συχνά στο κέντρο μιας συλλογής μορίων διαλύτη, με θέσεις που λαμβάνονται από προσομοίωση του καθαρού διαλύτη. Στη συνέχεια επιλέγεται ένα αρχικό σύνολο ταχυτήτων ατόμων. Οι ταχύτητες συνήθως υπακούουν σε μια κατανομή Boltzmann για συγκεκριμένη θερμοκρασία. Η ορμή κάθε ατόμου και στη συνέχεια οι δυνάμεις σε κάθε άτομο υπολογίζονται από την ταχύτητα, τη μάζα και το επιλεγμένο πεδίο δύναμης. Οι νέες θέσεις για τα άτομα στη συνέχεια υπολογίζονται σε μεταγενέστερο στιγμιότυπο, που ονομάζεται βήμα του χρόνου, μαζί με νέες ταχύτητες και επιταχύνσεις. Αυτή είναι μια αριθμητική ενσωμάτωση των εξισώσεων κίνησης του Νεύτωνα χρησιμοποιώντας τις πληροφορίες που ελήφθησαν στα προηγούμενα βήματα. Οι ελαχιστοποιήσεις επαναλαμβάνονται ώστε το σύστημα να φτάσει σε ισορροπία. Μόλις το σύστημα φθάσει σε ισορροπία, αρχίζει η προσομοίωση του όπου οι ατομικές συντεταγμένες αποθηκεύονται για κάθε λίγες επαναλήψεις. Αυτός ο κατάλογος των συντεταγμένων με την πάροδο του χρόνου ονομάζεται τροχιά. Στο τέλος, οι τροχιές αναλύονται προκειμένου να ληφθούν πληροφορίες για το σύστημα.

Για να λειτουργήσει αυτό το σύστημα, το πεδίο δύναμης πρέπει να σχεδιαστεί έτσι ώστε να περιγράφει τις διαμοριακές δυνάμεις και δονήσεις μακριά από την ισορροπία. Εάν ο σκοπός της προσομοίωσης είναι να αναζητηθεί ο διαμορφωτικός χώρος, χρησιμοποιείται συχνά ένα πεδίο δύναμης σχεδιασμένο για βελτιστοποίηση γεωμετρίας. Για την προσομοίωση συστημάτων, είναι πιο συνηθισμένο να χρησιμοποιούμε ένα πεδίο δύναμης που έχει σχεδιαστεί γι' αυτό τον σκοπό, όπως τα πεδία δύναμης AMBER [161], CHARMM [162] ή OPLS [163]. Η ανάπτυξη διαφορετικών λογισμικών σε συνδυασμό με την ύπαρξη πληθώρας συστημάτων (πχ, πρωτεΐνες, μεμβράνες, νουκλεϊκά οξέα), οδήγησε στη δημιουργία αρκετών πεδίων δυνάμεων. Η διαφορά τους βρίσκεται στην παραμετροποίηση για τον υπολογισμό των αλληλεπιδράσεων. Για παράδειγμα τα πεδία δυνάμεων AMBER και CHARMM χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό δυναμικής ενέργειας σε πρωτεΐνες, μεμβράνες και νουκλεϊκά οξέα, ενώ το OPLS χρησιμοποιείται κυρίως για τις προσομοιώσεις κρυστάλλων [164].

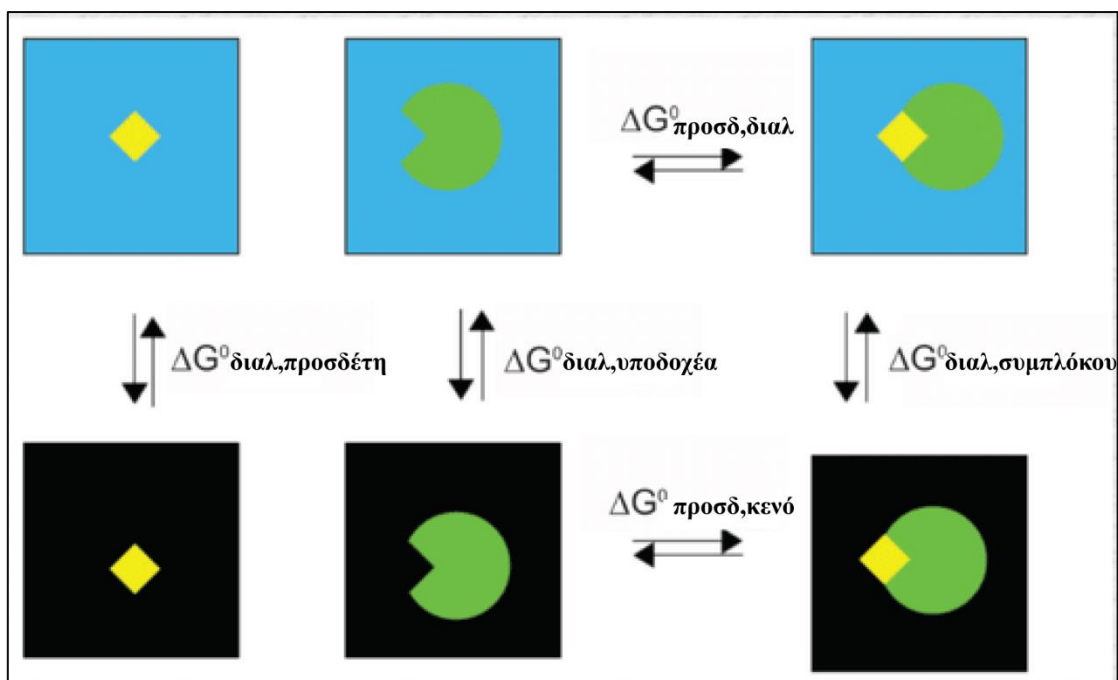
Παράλληλα, υπάρχουν αρκετοί αλγόριθμοι διαθέσιμοι για την εκτέλεση της αριθμητικής ενσωμάτωσης των εξισώσεων κίνησης. Οι αλγόριθμοι Verlet και

ταχύτητας Verlet χρησιμοποιούνται ευρέως επειδή απαιτούν ελάχιστη ποσότητα μνήμης υπολογιστή και χρόνου CPU ή GPU [165]. Χρησιμοποιούνται οι θέσεις και οι επιταχύνσεις των ατόμων στο τρέχον βήμα για να υπολογιστούν οι θέσεις για το επόμενο βήμα. Οι αλγόριθμοι Verlet περιέχουν συχνά ένα βήμα στο οποίο οι ταχύτητες μεταβάλλονται για να διορθωθούν μικρά σφάλματα στην ολοκλήρωση, προσομοιώνοντας έτσι ένα σύστημα σταθερής θερμοκρασίας. Η επιλογή ενός χρονικού βήματος είναι σημαντική. Ένα χρονικό βήμα που είναι πολύ μεγάλο θα οδηγήσει τα άτομα να απομακρύνονται από το μήκος μιας δεδομένης τροχιάς, με αποτέλεσμα να προσομοιώνουν ελάχιστα την κίνηση. Ένα χρονικό βήμα που είναι πολύ μικρό θα καταστήσει αναγκαία την εκτέλεση περισσότερων επαναλήψεων, με αποτέλεσμα να διαρκέσει περισσότερο χρονικό διάστημα η εκτέλεση μιας προσομοίωσης. Ένας γενικός κανόνας είναι ότι το χρονικό βήμα πρέπει να είναι μία τάξη μεγέθους μικρότερη από το χρονοδιάγραμμα της μικρότερης κίνησης (περίοδος δόνησης ή χρόνος μεταξύ συγκρούσεων). Αυτό δίνει ένα χρονικό βήμα της τάξης των δεκάδων femtoseconds για προσομοίωση ενός υγρού από άκαμπτα μόρια και δέκατα ενός femtosecond για προσομοίωση δόνησης μορίων.

1.7.5 Μέθοδος MM-PBSA

Ο γενικός στόχος της εφαρμογής της μεθόδου MM-PBSA και της συμπληρωματικής μεθόδου MM-GBSA είναι ο υπολογισμός της διαφοράς ελεύθερης ενέργειας μεταξύ δύο καταστάσεων που αντιπροσωπεύουν συχνότερα τη δεσμευμένη και μη δεσμευμένη κατάσταση δύο επιδιαλυτωμένων μορίων. Εναλλακτικά, μπορεί να συγκριθεί η ελεύθερη ενέργεια δύο διαφορετικών επιδιαλυτωμένων διαμορφωμερών του ίδιου μορίου [166]

Στην προσομοίωση αυτών των διαλυτωμένων καταστάσεων, η πλειονότητα των ενεργειακών συνεισφορών θα προέρχονταν από τις αλληλεπιδράσεις διαλύτη-διαλύτη και οι διακυμάνσεις της συνολικής ενέργειας θα ήταν αναμενόμενα πολυπληθής. Επομένως, ο υπολογισμός θα απαιτούσε υπερβολικό χρόνο. Μια πιο αποτελεσματική μέθοδος είναι να διαιρεθεί υπολογισμός αυτός σύμφωνα με τον ακόλουθο θερμοδυναμικό κύκλο (Σχήμα 17)



Σχήμα 17 Υπολογισμός ενέργειας μέσω της μεθόδου MM-PBSA.

Από αυτό το διάγραμμα η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης κατά Gibbs εξάγεται από τον τύπο:

$$\Delta G_{\text{προσδ,διαλ}}^0 = \Delta G_{\text{προσδ,κενό}}^0 + \Delta G_{\text{διαλ,συμπλόκου}}^0 - (\Delta G_{\text{διαλ,προσδέτη}}^0 + \Delta G_{\text{διαλ,υποδοχέα}}^0)$$

Εξίσωση 1-5

Στην προσέγγιση MM-PBSA οι διαφορές συνεισφορές στην παραπάνω ελεύθερη δέσμευση ενέργειας υπολογίζονται με διάφορους τρόπους:

Οι ελεύθερες ενέργειες διαλυτοποίησης υπολογίζονται με την επίλυση της γραμμικής εξίσωσης Poisson Boltzman ή Generalized Born για κάθε μια από τις τρεις καταστάσεις, προσδεμένη στο κενό, προσδεμένη σε διάλυμα και μη προσδεμένη σε διάλυμα, (αυτό δίνει την ηλεκτροστατική συμβολή στην ελεύθερη διαλυτοποίηση) και προσθέτοντας έναν εμπειρικό όρο για τις υδρόφοβες συνεισφορές.

Η $\Delta G_{\text{κενού}}$ λαμβάνεται με υπολογισμό της μέσης ενέργειας αλληλεπίδρασης μεταξύ υποδοχέα και προσδέτη και λαμβάνοντας υπόψη την αλλαγή της εντροπίας κατά τη δέσμευση εάν είναι απαραίτητο/επιθυμητό.

Η εντροπική συνεισφορά μπορεί να βρεθεί με την πραγματοποίηση της NMODE ανάλυσης στις τρεις καταστάσεις, αλλά στην πράξη η συνεισφορά εντροπίας μπορεί να παραμεληθεί εάν επιθυμείται μόνο η σύγκριση καταστάσεων παρόμοιας εντροπίας, όπως δύο προσδέματα που συνδέονται με την ίδια πρωτεΐνη. Ο λόγος γι' αυτό είναι ότι οι υπολογισμοί NMODE είναι υπολογιστικά εντατικοί και τείνουν να παρουσιάζουν ένα μεγάλο περιθώριο σφάλματος που εισάγει σημαντική αβεβαιότητα στο αποτέλεσμα. Οι μέσες ενέργειες αλληλεπίδρασης του υποδοχέα και του προσδέτη λαμβάνονται συνήθως με τη διεξαγωγή υπολογισμών σ' ένα σύνολο μη συσχετισμένων στιγμιότυπων που συλλέγονται από μια προσομοίωση μοριακής δυναμικής (MD) που έχει έρθει σε ισορροπία (equilibrated).

1.7.6 Φθορισμομετρία

Η φθορισμομετρία είναι μια πολυσύνθετη αναλυτική τεχνική που επιτρέπει ποσοτικούς και ποιοτικούς προσδιορισμούς μεταβλητών των εξεταζόμενων συστημάτων. Οι μεταβλητές, οι οποίες συνήθως μπορούν να μετρηθούν είναι η μοριακή απορροφητικότητα (ϵ), τα φάσματα απορρόφησης ή διέγερσης και το φάσμα εκπομπής, ο συντελεστής κβαντικής απόδοσης (Φ), ο χρόνος ζωής διεγερμένης κατάστασης (τ), καθώς και η πόλωση φθορισμού (P).

Σύμφωνα με το νόμο απορρόφησης του Lambert-Beer η ισχύς της απορροφούμενης ακτινοβολίας δίνεται από τη σχέση:

$$I_A = I_0 - I_1 = I_0 (1 - 10^{-\epsilon l c}) \quad \text{Εξίσωση 1-6}$$

Η ισχύς της ακτινοβολίας φθορισμού, I_F , είναι συνάρτηση της ισχύος της απορροφούμενης ακτινοβολίας, I_A , και της κβαντικής απόδοσης φθορισμού, Φ .

$$I_F = \Phi I_A = \Phi_F I_0 (1 - 10^{-\epsilon l c}) \quad \text{Εξίσωση 1-7}$$

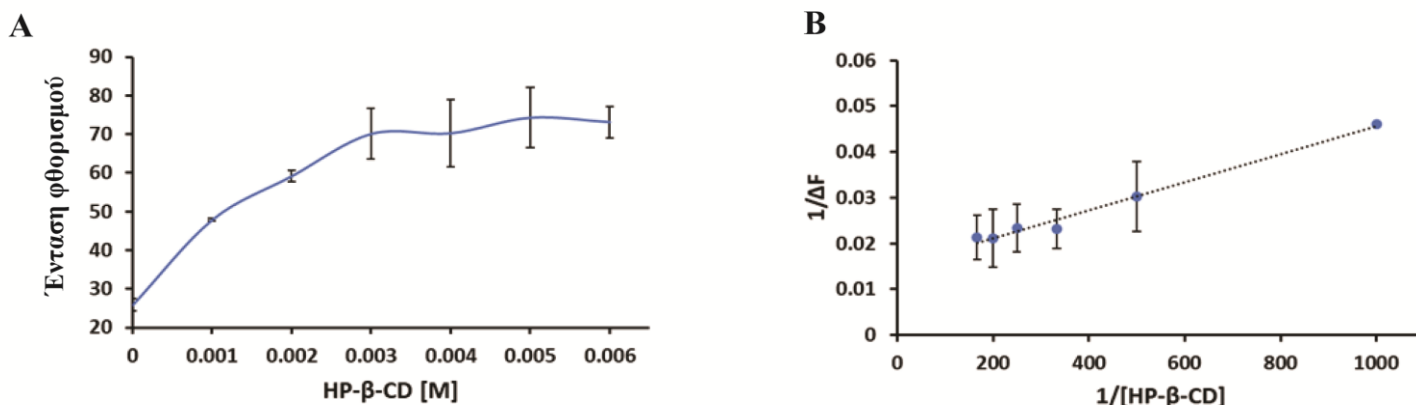
Η κβαντική απόδοση, Φ , ορίζεται ως ο λόγος του αριθμού των εκπεμπόμενων φωτονίων προς τον αριθμό των απορροφούμενων φωτονίων. Η κβαντική απόδοση δε μπορεί να υπερβεί τη μονάδα ($0 < \Phi < 1$) κατά τη διάρκεια των κανονικών τύπων φθορισμού. Είναι δε σταθερή για μια συγκεκριμένη ουσία υπό δεδομένες πειραματικές συνθήκες.

Η σταθερά πρόσδεσης υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση.

$$\frac{1}{\Delta F} = \frac{1}{K_c} \Delta F_c * \frac{1}{[CD]} + \Delta F_c \quad \text{Εξίσωση 1-8 (Benesi-Hildebrand)}$$

Όπου ΔF είναι η διαφορά μεταξύ των εντάσεων φθορισμού απουσία και παρουσίας HP- β -CD, K_c η σταθερά πρόσδεσης, ΔF_c η διαφορά στην ένταση μεταξύ ελεύθερου και συμπλοκοποιημένου φαρμάκου σε μοριακή αναλογία 1:1 και $[CD]$ η συγκέντρωση της HP- β -CD [167].

Αρχικά, γίνεται η μέτρηση των μέγιστων τιμών φθορισμού σε σχέση με τη συγκέντρωση της HP- β -CD (Σχήμα 18,Α). Στη συνέχεια για κάθε μέγιστη τιμή φθορισμού του συμπλόκου αφαιρείται η τιμή φθορισμού του φαρμάκου απουσία κυκλοδεξτρίνης και προκύπτει το ΔF της εξίσωσης 1-8. Το διάγραμμα της ΔF με το $1/[CD]$ επιτρέπει τον υπολογισμό της σταθεράς K_c χρησιμοποιώντας την γραμμική εξίσωση $y=ax+\beta$ όπου $a=1/K_c*\Delta F_c$ και $\beta=\Delta F_c$ (Σχήμα 18, Β).



Σχήμα 18 Παράδειγμα υπολογισμού σταθεράς πρόσδεσης μιας αντίδρασης μέσω της φθορισμομετρίας. **A)** Η σύμπλεξη της ιριμπεσαρτάνης με την HP- β -CD αυξάνει τον φθορισμό της. **B)** Η σταθερά σύμπλεξης υπολογίζεται μέσω της εξίσωσης Benesi-Hildebrand στα $503 \pm 90 \text{ M}^{-1}$.

1.7.7 Φασματομετρία μάζας

Φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) ονομάζεται η αναλυτική τεχνική κατά την οποία τα μόρια (συστατικά) ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε σχέση με τον λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z). Η φασματομετρία μαζών είναι μια από τις πλέον διαδεδομένες τεχνικές ανάλυσης και εφαρμόζεται, ευρέως, σε πολλούς τομείς τεχνολογίας και έρευνας. Η πρόοδος στη μικροηλεκτρονική και οι αυξανόμενες απαιτήσεις στη χημική ανάλυση, έχουν προωθήσει την ανάπτυξη της τεχνικής

και την έχουν καταστήσει απαραίτητο εργαλείο για μεγάλο φάσμα επιστημονικών, ερευνητικών δραστηριοτήτων. Κύριο πεδίο εφαρμογής είναι οι επιστήμες ζωής, των τροφίμων, οι περιβαλλοντικές επιστήμες και οι τεχνολογίες omics. Αυτό συμβαίνει γιατί η φασματομετρία μαζών προσφέρει πληροφορίες για:

α) την ποιοτική και ποσοτική σύσταση αγνώστων μιγμάτων,

β) τη χημική δομή πολύ μεγάλου αριθμού ενώσεων,

γ) την παρουσία και το ποσοστό ισοτόπων,

δ) τη δομή και σύσταση επιφανειών με μορφή απεικόνισης (MS Imaging).

Η δυναμική της φασματομετρίας μαζών στη βιοανάλυση θα μπορούσε να αποδοθεί στις εξής ιδιότητες:

α) τη μεγάλη εκλεκτικότητα που επιτυγχάνεται με την ακριβή μέτρηση των σχετικών μοριακών μαζών, γεγονός που επιτρέπει την απόλυτη ταυτοποίηση ενώσεων ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Η δυνατότητα αυτή έχει ως αποτέλεσμα την απόλυτη κυριαρχία των τεχνικών LC-MS στον έλεγχο τοξικότητας μεταβολισμού φαρμάκων και φαρμακοκινητικής, στη φαρμακευτική βιομηχανία (99% των εφαρμογών είναι σε LC-MS ήδη από το 2008). Αντίστοιχη είναι η εφαρμογή της MS σε περιπτώσεις ελέγχου απαγορευμένων ενώσεων π.χ. αντι-ντόπινγκ (anti-doping), έλεγχος ναρκωτικών κ.ά.

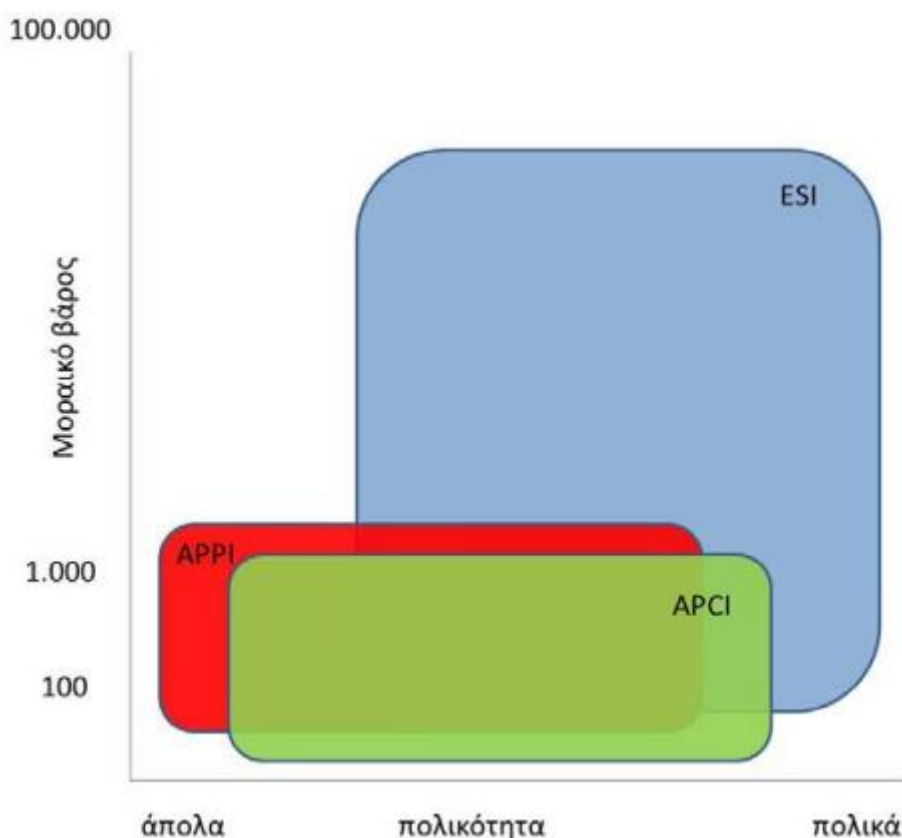
β) την πολύ υψηλή ευαισθησία, που φτάνει έως τα 10^{-18} mol.

γ) το γεγονός ότι η φασματομετρία μαζών μπορεί θεωρητικά να δράσει ως ολικός ανιχνευτής (universal detector) και επομένως, να εφαρμοστεί για την ανάλυση οποιασδήποτε ενώσεως.

δ) τη δυνατότητα εύρεσης δομής αγνώστων ενώσεων, η οποία έχει βρει μεγάλη εφαρμογή στις τεχνολογίες omics (μεταβολομική, γονιδιωματική και άλλες) καθώς επιτυγχάνει αποδοτική εύρεση δομής πεπτιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεοτιδίων.

Τα πλεονεκτήματα αυτά την καθιστούν πολύ σημαντικό εργαλείο στη διάθεση των ερευνητών για την ταυτοποίηση αγνώστων δειγμάτων [168].

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI) κατέχει κυρίαρχη θέση μεταξύ των μεθόδων ιοντισμού υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Ionization, API methods) και αποτελεί τη μέθοδο επιλογής για τη σύζευξη της υγρής χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μάζας (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS). Επίσης, έχει συμβάλει στην επέκταση των αναλυτικών εφαρμογών της φασματομετρίας μάζας στους τομείς της βιολογίας και των βιοϊατρικών επιστημών και επί του παρόντος, συγκαταλέγεται ανάμεσα στις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους ιοντισμού. Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό είναι μία ήπια μέθοδος ιοντισμού, με την οποία επιτυγχάνεται η μεταφορά των ουσιών από το διάλυμα στην αέρια φάση ως ιόντα. Χρησιμοποιείται κυρίως για την ανάλυση μεγάλων, μη-πτητικών, ιοντίσιμων μορίων, όπως οι πρωτεΐνες. Ωστόσο, εφαρμόζεται αποτελεσματικά σε μικρά πολικά μόρια, ιοντικά σύμπλοκα μετάλλων και άλλες ανόργανες ουσίες (Σχήμα 19). Το διάλυμα ηλεκτροψεκασμού αποτελείται από τον πτητικό διαλύτη που περιέχει την ουσία σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση. Η μεταφορά της ουσίας από το αρχικό διάλυμα στην αέρια φάση ως ιόντα ξεκινάει υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης και καταλήγει σταδιακά στο υψηλό κενό του αναλυτή μάζας. Επιπλέον, ένα άλλο χαρακτηριστικό του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό είναι ο σχηματισμός πολλαπλά φορτισμένων ιόντων στην περίπτωση των μεγαλομοριακών ουσιών. Αυτή η πολλαπλή φόρτιση μειώνει την κλίμακα των λόγων m/z κατά τον αριθμό των φορτίων και ως εκ τούτου μετατοπίζει τα ιόντα σε ένα εύρος τιμών m/z κατάλληλο για τους περισσότερους αναλυτές μάζας [169].

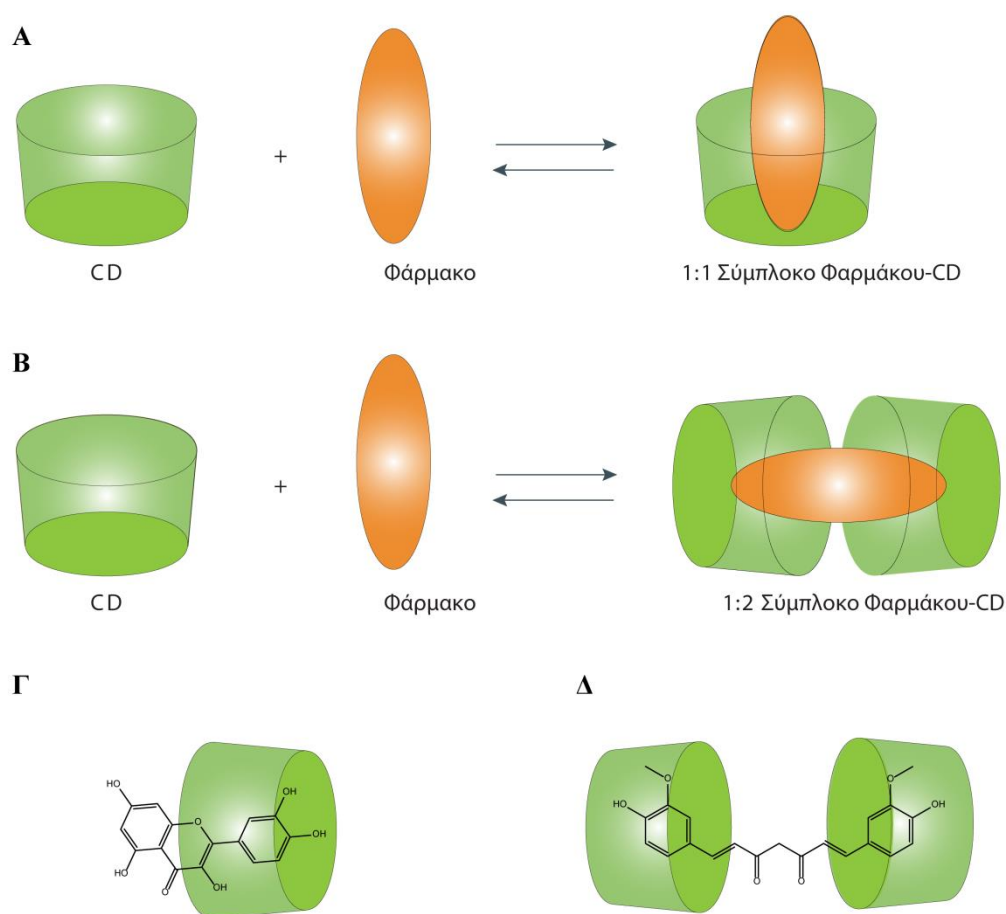


Σχήμα 19 Το πεδίο εφαρμογής των τεχνικών ιοντισμού σε ατμοσφαιρική πίεση: στους δύο άξονες αναγράφονται η πολικότητα και το μοριακό βάρος των αναλυόμενων ενώσεων [168]. *APCI=Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (Χημικός ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση)*, *APPI=Atmospheric Pressure Photo Ionisation (Φωτοϊοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση)*.

1.8 Κερκετίνη

Η κερκετίνη είναι ένα από τα πλέον συχνά ευρισκόμενα φλαβονοειδή στη φύση [170]. Είναι ισχυρό αντιοξειδωτικό και έχει μελετηθεί εκτενώς για τις ευνοϊκές βιολογικές και φαρμακευτικές του ιδιότητες. Έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει ευρύ φάσμα ευεργετικών βιολογικών αποτελεσμάτων για την υγεία, όπως των αντιοξειδωτικών, αντικαρκινικών και αντιϊικών λειτουργιών καθώς και κατά των ελευθέρων ριζών [171]. Ωστόσο, η κερκετίνη είναι ελάχιστα διαλυτή στο νερό έχοντας περιορισμένη απορρόφηση στην από του στόματος χορήγηση. Επιπλέον, είναι χημικά ασταθής, ειδικά σε υδατικό αλκαλικό μέσο [172], αν και υπό όξινες συνθήκες μπορεί να προσφέρει κάποια προστασία έναντι της αποικοδόμησής της. Η ένωση υφίσταται επίσης εκτεταμένο μεταβολισμό στο έντερο και στο ήπαρ μετά την απορρόφηση [173] και οι μεταβολίτες που

προκύπτουν εξακολουθούν να διατηρούν κάποια βιολογική λειτουργία [174]. Όλα αυτά τα προβλήματα οδηγούν σε μια εξαιρετικά χαμηλή από το στόμα βιοδιαθεσιμότητα της κερκετίνης στον άνθρωπο [175]. Στη φαρμακευτική ανάπτυξη του προϊόντος, οι β-κυκλοδεξτρίνες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την αντιμετώπιση των προαναφερθέντων φυσικοχημικών προβλημάτων που σχετίζονται με τη διαμόρφωση συγκεκριμένων υποψήφιων φαρμάκων. Η μεθοδολογία παρουσιάζεται στο σχήμα 20. Τρία είδη β-CD, HP-β-CD και SBE-β-CD μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτίωση της χημικής σταθερότητας και διαλυτότητας της κερκετίνης μέσω της σύμπλεξης κερκετίνης/β-CD.



Σχήμα 20 Μεθοδολογία σύμπλεξης φαρμάκων στις κυκλοδεξτρίνες. (A) Δημιουργία συμπλόκου 1:1, (B) Δημιουργία συμπλόκου 1:2, (Γ) Παράδειγμα δημιουργίας συμπλόκου 1:1 με κερκετίνη, (Δ) Παράδειγμα δημιουργίας συμπλόκου 1:2 με την κουρκουμίνη καθώς ο δύσκαμπτος και ευθύγραμμος σκελετός της το ευνοεί.

1.9 Καφεϊκό και ροσμαρινικό οξύ

Το καφεϊκό οξύ (3,4-διυδροξυκιναμωμικό οξύ-CA) και το ροσμαρινικό οξύ (RA) (Σχήμα 18), το διμερές του που απομονώθηκε από το φυτό *Rosmarinus Officinalis*, είναι φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν σε αφθονία στη φύση, γνωστές για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητές τους, ενώ ταυτόχρονα βοηθούν στην ανάρρωση από διάφορες ασθένειες [176-180]. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι το καφεϊκό οξύ παρουσιάζει σημαντική αντιδιαβητική δραστηριότητα στους νεφρούς των διαβητικών ποντικών [181], το ροσμαρινικό οξύ υπάρχει στο υδατικό εκχύλισμα των *Simcin canim sims* που εμφανίζει αντιδιαβητική δράση [182] ενώ και οι δύο ενώσεις προτείνονται πλέον για τη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη [183]. Το καφεϊκό οξύ μπορεί να βελτιώσει τη βιωσιμότητα των κυττάρων, δρα προστατευτικά σε πιθανή βλάβη του DNA [184], παρουσιάζει σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες [185] και αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά ινোসαρκώματος του HT-1080 [186]. Το ροσμαρινικό οξύ έχει αποδειχθεί ότι δρα νευροπροστατευτικά στις επαγόμενες νευρωνικές βλάβες κυττάρων N2A που προκαλείται από H₂O₂ [187]. Επίσης, παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δράση σε μοντέλα συστηματικών και τοπικών φλεγμονωδών διαταραχών που πραγματοποιούνται σε αρουραίους [188], εμφανίζει αντιμεταλλαξιογόνες ιδιότητες έναντι του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου ντοξορουμπικίνη (doxorubicin) [189], αντιβακτηριδιακή συνέργεια με αντιβιοτικά [190], αντιικές ιδιότητες έναντι του ιού της ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας [191] και είναι πιθανό να δρα ρυθμιστικά στην αναστολή της έκφρασης της 2,3-διοξυγενάσης ινδολαμίνης των δενδριτικών κυττάρων [192]. Τόσο το ροσμαρινικό όσο και το καφεϊκό οξύ δημιουργούν σταθερά σύμπλοκα με την HP-β-CD, έχοντας 1:1 στοιχειομετρία (Σχήμα 20), όπως έδειξαν προηγούμενες μελέτες [193, 194].

1.10 Καντεσαρτάνη και η σιλεξετίλη της

Οι αναστολείς του συστήματος αλδοστερόνης ρενίνης-αγγειοτασίνης (RAASIs) αποτελούν σημαντικά φαρμακευτικά προϊόντα για τη θεραπεία καρδιαγγειακών και νεφρικών ασθενειών. Μία από αυτές τις κατηγορίες των μορίων αυτών είναι οι αναστολείς του υποδοχέα της αγγειοτασίνης AT1 (ARBs) ή αλλιώς σαρτάνες. Είναι γνωστό ότι οι σαρτάνες δρουν ως αντιυπερτασικά φάρμακα εμποδίζοντας

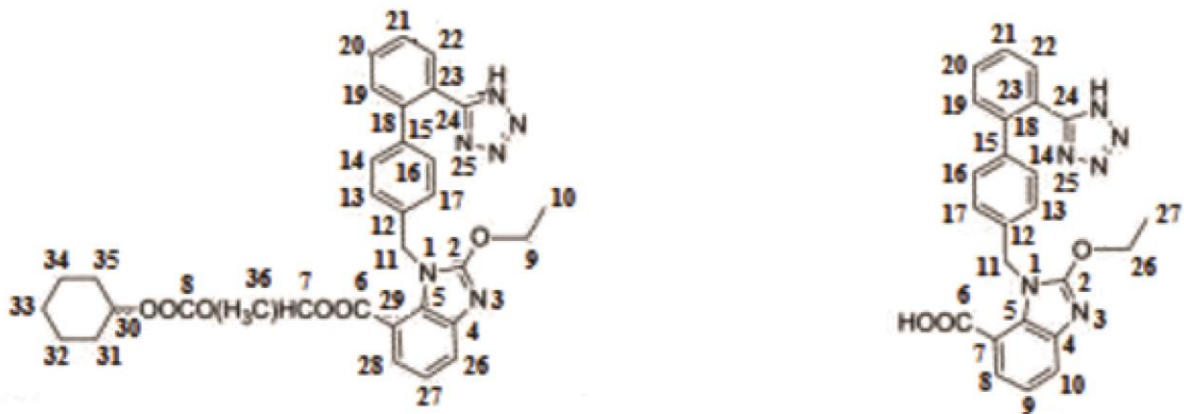
την επιζήμια δράση της οκταπεπτιδικής ορμόνης αγγειοτασίνης II που διεγείρει τους AT1 υποδοχείς σε παθολογικές καταστάσεις [195, 196].

Η καντεσαρτάνη (CAN, επίσης γνωστή ως CV-11974) είναι ένα πολύ γνωστό αντιυπερτασικό φάρμακο όπως και ο ενεργός μεταβολίτης της, η σιλεξετίλη της καντεσαρτάνης (CC, επίσης γνωστή ως TCV-116, Atacand) (Σχήμα 21) και ανήκουν στις σαρτάνες με πρωτότυπη ένωση τη λοσαρτάνη. Η CAN χαρακτηρίζεται ως μη ανταγωνιστικός ανυπέρβλητος (insurmountable) ανταγωνιστής με την υψηλότερη συγγένεια με τον υποδοχέα AT1 σε σύγκριση με τις άλλες γνωστές σαρτάνες [195].

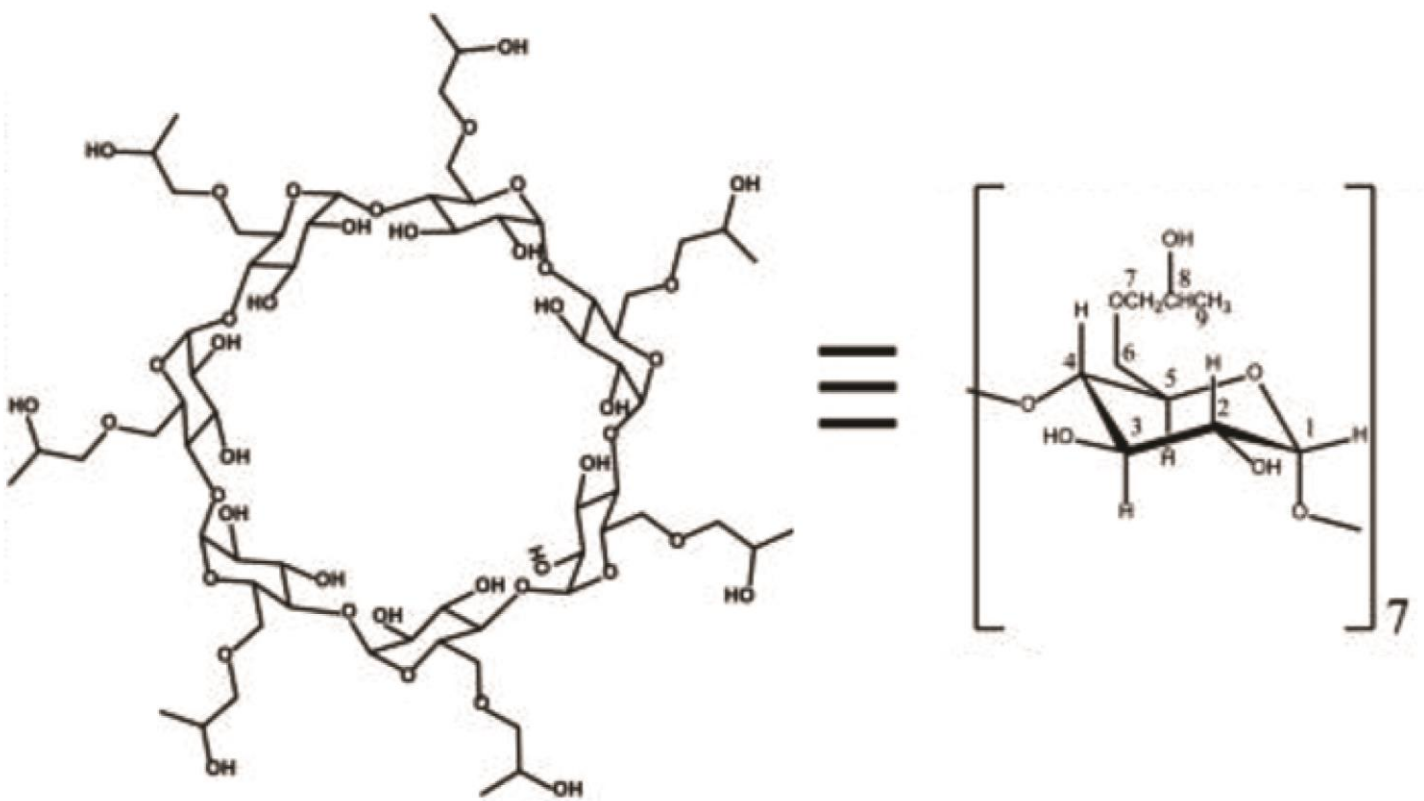
Σε μια από τις προηγούμενες μελέτες μας συγκρίναμε τις αλληλεπιδράσεις της CAN και της λοσαρτάνης με λιπιδικές διπλοστιβάδες. Γενικότερα, τα λιπόφιλα μόρια προτιμούν να ενσωματώνονται σε λιπιδικές διπλοστιβάδες και στη συνέχεια μέσω πλευρικής διάχυσης να φθάσουν στη θέση του υποδοχέα [197]. Η πρόσδεση μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω ενός μηχανισμού δύο σταδίων (ενσωμάτωση-διάχυση). Επίσης δεν αποκλείεται η άμεση δέσμευση της CAN στο ενεργό σημείο. Μπορούν επίσης, οι σαρτάνες να δράσουν και μέσω των δύο μηχανισμών. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν υποδεικνύουν πιθανή σχέση μεταξύ της αποτελεσματικότητας της διάχυσης και της φαρμακολογικής ισχύος των δύο σαρτάνων. Η λοσαρτάνη έτεινε να σχηματίζει διαφορετικά τμήματα (domains) στις λιπιδικές διπλοστιβάδες και αυτό θα μπορούσε πιθανώς να επιβραδύνει τη διάχυσή της προς την ενεργό θέση του υποδοχέα AT1. Η διάχυση μπορεί επίσης να επιβραδυνθεί με την ισχυρότερη πρόσδεσή της στην περιοχή της ομάδας πολικής κεφαλής καθώς και την επαγωγή του αποτελέσματος του φαινομένου ενδοεπιχώρησης ή ενδοπεριχώρησης (interdigitation effect). Αντιθέτως, η CAN προκάλεσε ηπιότερες διαμορφωτικές μεταβολές. Για τους παραπάνω λόγους η διάχυσή της στις λιπιδικές διπλοστιβάδες μπορεί να διευκολυνθεί [196].

Οι επιδράσεις του προφαρμάκου CC σε λιπιδικές διπλοστιβάδες έχουν μελετηθεί και συγκριθεί με ολμεσαρτάνη και άλλους ανταγωνιστές της AT1 [197]. Σε αυτές τις μελέτες η εφαρμογή ενός συνδυασμού διαφόρων συμπληρωματικών βιοφυσικών τεχνικών Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC), φασματοσκοπία Raman, Μικρής γωνίας περίθλασης ακτίνων-X (SAXS), Ευρείας γωνίας περίθλασης ακτίνων-X (WAXS), ssNMR, μοριακή μοντελοποίηση]

αναδεικνύει την πολυπλοκότητα της αλληλεπίδρασης των ανταγωνιστών AT1. Το κύριο κοινό χαρακτηριστικό όλων αυτών των ανταγωνιστών AT1 είναι ότι είναι προσαρμοσμένοι στην πολική/άπολη διεπιφάνεια των λιπιδικών διπλοστιβάδων. Κάθε σαρτάνη χαρακτηρίζεται από το δικό της «δακτυλικό αποτύπωμα» όσον αναφορά τις θερμικές και δυναμικές μεταβολές που προκαλεί στις μεμβράνες, το προσανατολισμό και τον εντοπισμό σε λιπιδικές διπλοστιβάδες. Το «δακτυλικό αποτύπωμα» μπορεί να είναι απαραίτητο για τη δράση του φαρμάκου και έτσι ο μελλοντικός σχεδιασμός φαρμάκων δεν πρέπει να λαμβάνει υπόψη μόνο την άμεση δράση φαρμάκων με το ενεργό κέντρο, αλλά και τις συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις φαρμάκου-διπλοστιβάδας, προκειμένου να προβλέψει την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων.



A) Σιλεξετίλη της καντεσαρτάνης (TCV-116) B) Καντεσαρτάνη (CV-11974)



Γ) HP-β-CD

Σχήμα 21 Δομή της A) Σιλεξετίλης της καντεσαρτάνης B) Καντεσαρτάνης, Γ) Υδροξυπρόπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Σκοπός της διδακτορικής διατριβής

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτελεί η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυσικών προϊόντων και αντιυπερτασικών AT1 ανταγωνιστών με την κυκλοδεξτρίνη HP-β-CD χρησιμοποιώντας υπολογιστικές κυρίως καθώς και αναλυτικές μεθόδους. Ταυτόχρονα, εξετάζεται η συνεισφορά της συμπλοκοποίησης στη βιοδιαθεσιμότητα τους.

Στο κεφάλαιο 3 παρουσιάζονται οι μέθοδοι που ακολουθήθηκαν σε κάθε πειραματική διαδικασία. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν είναι: Μοριακή πρόσδεση, μοριακή δυναμική, Φασματοσκοπία NMR υγρής και στερεής κατάστασης, θερμιδομετρία ισοθερμικής τιπλοδότησης (ITC), φθορισμομετρία και φασματομετρία μάζας.

Στο κεφάλαιο 4 μελετάται η δυνατότητα συμπλοκοποίησης δυο γνωστών φυσικών προϊόντων, του καφεϊκού και του ροσμαρινικού οξέος, τα οποία παρά τις ευνοϊκές ιδιότητες που έχουν για την υγεία παρουσιάζουν μικρή βιοδιαθεσιμότητα. Η αμφίφιλη δομή τους καθώς και το σχετικά μικρό μέγεθος τους ευνοεί την αυθόρμητη συμπλοκοποίηση με τις κυκλοδεξτρίνες.

Τέλος, στο κεφάλαιο 5 εξετάζεται η δημιουργία συμπλόκου κυκλοδεξτρίνης ενός εμπορικά διαθέσιμου φαρμακευτικού μορίου, συγκεκριμένα της καντεσαρτάνης και του προφαρμάκου σιλεξιτίλη της καντεσαρτάνης, με σκοπό την αύξηση της βιοδραστικότητας και ελάττωση της δοσολογίας.

Στη διδακτορική αυτή διατριβή αποδεικνύεται επομένως η χρησιμότητα των κυκλοδεξτρίνων στην δημιουργία συμπλόκων με φυσικά προϊόντα προσδίδοντας τους βελτιωμένα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά καθώς και την πιθανή φαρμακευτική βελτιστοποίηση ήδη εμπορικά διαθέσιμου φαρμακευτικού προϊόντος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Υλικά και μέθοδοι

3.1 Για το καφεϊκό και ροσμαρινικό οξύ:

3.1.1 Συμπλοκοποίηση

Τα λυοφιλοποιημένα σύμπλοκα του CA και RA με HP-β-CD (CA-HP-β-CD, RA-HP-β-CD) παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας μια διαδικασία ξήρανσης με ψύξη.

Τα υδατικά διαλύματα RA-HP-β-CD με τη λυοφιλοποίηση παρασκευάστηκαν σε γραμμομοριακή αναλογία 1:2. Ειδικότερα, ζυγίστηκαν 0,030 gr RA και 0,229 gr HP-β-CD με ακρίβεια, μεταφέρθηκαν σε ποτήρι ζέσεως των 50 mL και εναιωρήθηκαν με 20 mL νερού. Στη συνέχεια προστέθηκαν ποσότητες υδροξειδίου του αμμωνίου υπό συνεχή ανάδευση και pH μέχρις ότου ολοκληρωθεί η διάλυση και η ρύθμιση του pH έγινε με NH₃ 5N περίπου στο 10,5. Το προκύπτον διάλυμα σε μοριακή αναλογία 1:2 καταψύχθηκε σε -80°C και λυοφιλοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον Kryodos-50 Telstar λυοφιλοποιητή. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της κυρίας Βαλαμής στο εργαστήριο της Φαρμακευτικής Αθηνών.

3.1.2 Πειράματα NMR

Φασματοσκοπία ssNMR

Τα πειράματα ¹³C NMR πραγματοποιήθηκαν σε φασματόμετρο Bruker 600 WB Avance I εξοπλισμένο με ανιχνευτή HX 4 mm MAS στο πανεπιστήμιο της Φρανκφούρτης. Διεξήχθη περιστροφή μαγικής γωνίας στα 12 kHz και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 310 K (37°C). Έφαρμόστηκε μεταφορά πόλωσης για τη διέγερση των ¹³C χρησιμοποιώντας μια γραμμική διαβάθμιση (linear ramp) 80%. Κατά τη διάρκεια της ανίχνευσης των ¹³C, εφαρμόστηκε 100 kHz Spinal-64 (35) αποσύζευξη πρωτονίων.

Όλα τα δείγματα είχαν ως αναφορά το σήμα της ομάδας CH που δίνουν οι ¹³C σε φυσική αφθονία αδαμαντίνης στα 38,48 ppm.

Φασματοσκοπία ¹H NMR υψηλής ανάλυσης

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα 2D ^1H - ^1H NOESY χρησιμοποιώντας φασματόμετρο Bruker AV-500 στους 298 K (25°C). Ο χρόνος ανάμιξης ρυθμίστηκε στα 300 ms και ο χρόνος εφησυχασμού ώστε να επανέλθει στην αρχική μαγνήτιση σε 2 δευτερόλεπτα. Τα δείγματα διαλύθηκαν σε 0,6 mL D₂O σε συγκέντρωση 10 mM και μεταφέρθηκαν σε σωλήνες NMR 5 mm. Το λογισμικό TopSpin 2.1 που παρέχεται από την εταιρεία Bruker χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία δεδομένων.

Φασματομετρία μάζας

Το σύστημα EVOQ™ Elite ER LC-TQ (Bruker, Germany) του εργαστηρίου του κύριου Τζάκου στα Ιωάννινα χρησιμοποιήθηκε για την πλήρη ανάλυση σάρωσης της HP-β-CD και των συμπλόκων της με CA και RA. Μια μικρή ποσότητα κάθε συμπλόκου (0,1 mg) διαλύθηκε σε dH₂O (καθαρότητας LC-MS, Fisher) και εγχύθηκε απευθείας στο φασματόμετρο. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με αρνητικό ιοντισμό, χρησιμοποιώντας έναν ανιχνευτή ESI. Η τάση ψεκασμού ρυθμίστηκε στα -4000 V, η θερμοκρασία θερμαινόμενου αισθητήρα στους 25 °C, η θερμαινόμενη ροή του αερίου καθετήρα σε 0 μονάδες, η ροή του κώνου αερίου σε 20 μονάδες, η θερμοκρασία του κώνου στους 300 °C και η ροή αερίου νεφελοποιητή στις 20 μονάδες. Η συλλογή και ανάλυση δεδομένων έγινε χρησιμοποιώντας το λογισμικό MSWS 8.2 που παρέχεται από την Bruker.

3.1.3 Μοριακή μοντελοποίηση

Οι αρχικές δομές των συστημάτων σχεδιάστηκαν και απεικονίστηκαν στο Maestro της σουίτας Schrodinger 2014.1. Συγκεκριμένα, η δομή του κυκλικού σακχάρου της HP-β-CD, του τμήματος β-CD, εισήχθη από την RCSB Πρωτεΐνη Data Bank (κωδικός BUVSEQ02). Το πεδίο δύναμης OPLS 2005 χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση ελαχιστοποίησης και το Glide XP (αλγόριθμος πρόσθετης ακρίβειας) [198] για βέλτιστη προσαρμογή των φιλοξενούμενων μορίων. Οι ευνοϊκότερες ενεργειακά πόζες αξιολογήθηκαν και προχώρησαν σε προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής

3.1.4 Μοριακή δυναμική

Το υποπρόγραμμα PMEMD της σουίτας AMBER 14 έχει αξιοποιηθεί μέσω προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής [199]. Η γεωμετρία των φυσικών ενώσεων

βελτιστοποιήθηκε με το Gaussian 09 και τα φορτία RESP εξήχθησαν με το antechamber.

Το λογισμικού προσομοίωσης AMBER χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστούν οι ενθαλπικές ενέργειες πρόσδεσης με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Οι ενθαλπίες πρόσδεσης υπολογίστηκαν από την εξίσωση 3-1.

$$\Delta H = \langle H \rangle_{\text{συμπλόκου}} + \langle H \rangle_{\text{νερού}} - \langle H \rangle_{\text{υποδοχέα}} - \langle H \rangle_{\text{ξενιζόμενου}} \quad \text{Εξίσωση 3-1}$$

ΌΠΟΥ ΤΟ $\langle H \rangle_{\text{συμπλόκου}}$, $\langle H \rangle_{\text{νερού}}$, $\langle H \rangle_{\text{υποδοχέα}}$ ΚΑΙ $\langle H \rangle_{\text{ξενιζόμενου}}$ ΕΙΝΑΙ ΟΙ ΜΕΣΕΣ ΣΥΝΟΛΙΚΕΣ ΠΙΘΑΝΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ Boltzmann για το σύμπλοκο, το νερό, τον ξενιστή (HP-β-CD) και του ξενιζόμενου μορίου δηλαδή το CA ή RA. Ο αριθμός των εξωτερικών μορίων νερού (explicit water) διατηρήθηκε ο ίδιος (1500) μεταξύ συμπλοκοποιημένου τμήματος της προσομοίωσης (σύμπλοκο και νερό) και του μη συμπλοκοποιημένου τμήματος προσομοίωσης. Τα αρχεία τοπολογίας (prmtop) και οι αρχικές συντεταγμένες (inpcrd) δημιουργήθηκαν με το tleap. Προκειμένου να παραχθεί ένας τέλειος κύβος προσομοίωσης, κάθε αρχείο αρχικών συντεταγμένων τροποποιήθηκε αναλόγως στα άκρα του.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν δύο στάδια ελαχιστοποίησης. Το πρώτο ακινητοποιεί το φυσικό προϊόν και χαλαρώνει τα μόρια του νερού, ενώ το δεύτερο άρει τον περιορισμό και επιτρέπει σε όλα τα άτομα να χαλαρώσουν. Τα τέσσερα υποσυστήματα στη συνέχεια θερμάνθηκαν στους 300K χρησιμοποιώντας θερμοστάτη Langevin (ntt=3). Διατηρώντας την πίεση σε 1 Bar, τα υποσυστήματα εξισορροπήθηκαν προκειμένου να προσεγγίσουν την πυκνότητα του νερού υπό κανονικές συνθήκες. Η επιπρόσθετη εξισορρόπηση οδήγησε στα τελικά μεγέθη των κύβων, με τη βοήθεια του awk, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν αργότερα στις προσομοιώσεις παραγωγής (production runs). Το σύστημα συνολικά προσομοιώθηκε για ένα μικροδευτερόλεπτο και αποθηκεύτηκαν πληροφορίες ενέργειας σε κάθε πικοδευτερόλεπτο. Τέλος, πραγματοποιήθηκε άμεση εκτίμηση της μέσης συνολικής δυναμικής ενέργειας από τα αρχεία εξόδου μοριακής δυναμικής χρησιμοποιώντας το awk.

3.1.5 Σύγκριση μοριακής δυναμικής με NOE

Οι αποστάσεις μεταξύ των μεμονωμένων υδρογόνων των φυσικών προϊόντων και ενός τύπου υδρογόνων της HP-β-CD (π.χ. RA_{H2}) υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη συνάρτηση ακτινικής κατανομής (radial) που παρέχεται

από το υποπρόγραμμα crrtraj του AMBER [200]. Η παράμετρος bin spacing (απόσταση μεταξύ των δεδομένων) ορίστηκε στα 0.5 για αυξημένη ευκρίνεια των διαγραμμάτων και το μέγιστο του διαγράμματος (maximum) στα 10 διότι αναζητήθηκαν κυρίως οι αποστάσεις που εμφανίζουν NOE σήματα (1-5.5Å). Συνολικά αναλύθηκαν 40000 στιγμιότυπα της μοριακής δυναμικής στην πειραματική διαδικασία.

3.1.6 Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης

Οι θερμοδυναμικές παράμετροι των αλληλεπιδράσεων CA-HP-β-CD και RA-HP-β-CD αξιολογήθηκαν μέσω θερμιδόμετρου MicroCal ITC200 του εργαστηρίου του κύριου Τζάκου στα Ιωάννινα και τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Origin for Microcal ITC. Οι τιμές της σταθεράς σύνδεσης (K_a), της στοιχειομετρίας (N), της μεταβολής αλλαγής της ενθαλπίας (ΔH) και της εντροπίας (ΔS) εκτιμήθηκαν απευθείας από το λογισμικό. Η πρότυπη ελεύθερη ενέργεια Gibbs (ΔG) προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \text{ Εξίσωση 3-2}$$

Η HP-β-CD (10 mM) και CA/RA (1 mM) διαλύθηκαν σε dH₂O, απαερώθηκαν και φορτώθηκαν στη σύριγγα και έπειτα στις κυψέλες. Οι τιτλοδοτήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 298 K. Η προγραμματιζόμενη τιτλοδότηση ελέγχθηκε με λογισμικό Origin για Microcal ITC και ο τιτλοδότης (titrant) εγχύθηκε στο δείγμα σε 16 δόσεις των 2 ml υπό συνεχή ανάδευση (1000 rpm). Η πρώτη τιτλοδότηση (0,4 ml) αποκλείστηκε από την ανάλυση δεδομένων. Η απόσταση μεταξύ δύο εγχύσεων ήταν 200 δευτερόλεπτα (αρκετή για να μη δημιουργούνται προβλήματα στη ρύθμιση της βασικής γραμμής (baseline)) και η ισχύς αναφοράς ρυθμίστηκε στην προεπιλεγμένη ρύθμιση των 6 μcal s⁻¹. Χρησιμοποιήθηκε μια περίοδος φίλτραρίσματος 3 δευτερολέπτων. Για να διορθωθεί η θερμική επίδραση λόγω ανάμιξης και αραιώσης, πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα ελέγχου με έγχυση του διαλύματος της HP-β-CD σε νερό. Τα δεδομένα αφαιρέθηκαν από το αρχικό πείραμα και οι θερμοδυναμικές τιμές υπολογίστηκαν με βάση το μοντέλο μιας θέσης πρόσδεσης.

3.2 Για την καντεσαρτάνη και τη σιλεξετίλη της καντεσαρτάνης:

3.2.1 Σύνθεση της Καντεσαρτάνης:

Η καντεσαρτάνη (CAN) ελήφθη χρησιμοποιώντας τη σιλεξετίλη ως πρόδρομη ένωση, η οποία προσφέρθηκε από τη φαρμακευτική εταιρεία CYPRIA. Η CAN συντέθηκε μέσω μιας πολύ απλής, βελτιστοποιημένης και αποτελεσματικής μεθόδου αλκαλικής υδρόλυσης (μεθανόλυση) που περιγράφεται στο άρθρο [201] και παρουσιάζεται στο σχήμα 22 και πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της κυρίας Βαλσαμή.



Σχήμα 22 Υδρόλυση της CC.

3.2.2 Παρασκευή των λυοφιλοποιημένων προϊόντων CAN-HP-β-CD και CC-HP-β-CD:

Εφαρμόστηκε μια διαδικασία ξήρανσης με ταυτόχρονη ψυξη για την παρασκευή λυοφιλοποιημένων συμπλόκων CAN ή CC-HP-β-CD στο εργαστήριο της κυρίας Βαλσαμή. Στην περίπτωση παρασκευής υδατικών διαλυμάτων CAN-HP-β-CD για λυοφιλοποίηση, χρησιμοποιήθηκε μέθοδος εξουδετέρωσης. Στη συνέχεια προστέθηκαν μικρές ποσότητες υδροξειδίου του αμμωνίου υπό συνεχή ανάδευση και παρακολούθηση του pH έως ότου ολοκληρωθεί η διάλυση και ρυθμίστηκε το pH σε τιμή περίπου 10,5. Το προκύπτον διάλυμα ακολούθως ξηράνθηκε με ψυξη χρησιμοποιώντας λυοφιλοποιητή Telstar τύπου Kryodos-50. Τα υδατικά διαλύματα CAN-και CC-HP-β-CD για λυοφιλοποίηση παρασκευάστηκαν σε γραμμομοριακή αναλογία 1:1 χρησιμοποιώντας 0,300 (ή 0,810 g CC) και 1,022 g HP-β-CD αντιστοίχως.

3.2.3 Μοριακή μοντελοποίηση.

Η κρυσταλλική δομή της σιλεξετίλης της καντεσαρτάνης (CC) λήφθηκε από την κρυσταλλογραφική βάση δεδομένων του Cambridge (κωδικός αναφοράς CSD: FETWEH). Οι κρυσταλλικές δομές της β-CD (κωδικός αναφοράς CSD BUVSEQ02) και CC επεξεργάστηκαν στο Schrodinger 2015.2 σε HP-β-CD και καντεσαρτάνης (CAN) αντίστοιχα. Το δυναμικό πεδίο OPLS3 χρησιμοποιήθηκε για την ελαχιστοποίηση της δομής των CAN, CC και HP-β-CD ενώ το GlideXP χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της πρόσδεσης [202]. Η HP-β-CD θεωρήθηκε ως υποδοχέας και η CAN ή CC ως προσδέτες. Υπάρχουν δύο πιθανές κατευθύνσεις για τις CAN και CC μέσα στην κοιλότητα της HP-β-CD. Και τα τέσσερα προκύπτοντα σύμπλοκα (δύο για κάθε φάρμακο) υποβλήθηκαν σε προσομοιώσεις MD.

Οι προσομοιώσεις MD πραγματοποιήθηκαν με την έκδοση που υπάρχει δυνατότητα χρήσης του επεξεργαστή γραφικών (GPU) του προγράμματος PMEMD 6 από το πακέτο προσομοίωσης AMBER 14. Η γεωμετρία και των δύο CC και CAN βελτιστοποιήθηκε με το βασικό σύνολο (basis set) HF 6-31G* του προγράμματος Gaussian 09. Το γενικευμένο πεδίο δύναμης του AMBER (GAFF) χρησιμοποιήθηκε για την απόκτηση παραμέτρων πεδίου ισχύος για τα CAN και CC με φορτία RESP. Το πεδίο δύναμης GLYCAM_06j-12 χρησιμοποιήθηκε για ν' αντιπροσωπεύει τη συμπεριφορά του τμήματος κυκλοδεξτρίνης του μορίου ξενιστή, ενώ το GAFF χρησιμοποιήθηκε για τις 2-υδροξυπροπυλομάδες. Έπειτα, υπολογίστηκαν τα φορτία RESP για την τροποποιημένη κυκλοδεξτρίνη. Το σύστημα ακολούθως διαλύθηκε χρησιμοποιώντας το μοντέλο ύδατος TIP3P σε οκτάεδρο με 4724 μόρια νερού. Η ελάχιστη απόσταση μεταξύ της ακμής του οκταέδρου και κάθε ατόμου του συστήματος καθορίστηκε στα 18 Å. Η ελαχιστοποίηση του συμπλόκου διεξήχθη για 5000 στάδια, χρησιμοποιώντας μέγιστη απόσταση απεικόνισης 18 Å σε σταθερό όγκο. Το επιδιαλυτωμένο σύμπλοκο στη συνέχεια θερμάνθηκε υπό σταθερό όγκο για 100 ps. Η θερμοκρασία αυξήθηκε σταδιακά από 0 σε 300 K χρησιμοποιώντας θερμοστάτη Langevin. Εφαρμόστηκαν σταθερές δύναμης (force constants) $10 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ στην HP-β-CD και αντίστοιχα στο φάρμακο (CAN ή CC). Στη συνέχεια, το σύστημα εξισορροπήθηκε υπό σταθερή πίεση σε δύο στάδια των 100 ps. Στο πρώτο, εφαρμόστηκαν σταθερές των 10 kcal mol^{-1}

Å⁻² στο σύμπλοκο, ενώ στο δεύτερο στάδιο όλοι οι περιορισμοί άρθηκαν. Τέσσερις συνολικοί υπολογισμοί MD (δύο για κάθε φάρμακο και στις δύο κατευθύνσεις) των 400 ns εκτελέστηκαν στους 300 K υπό σταθερή πίεση. Οι δεσμοί που περιλαμβάνουν άτομα υδρογόνου υπολογίστηκαν στην απόσταση ισορροπίας τους χρησιμοποιώντας SHAKE [203]. Η συχνότητα σύγκρουσης (collision frequency) γ ορίστηκε στα 2 ps⁻¹. Η ανάλυση των τροχιών εκτελέστηκε χρησιμοποιώντας το υποπρόγραμμα ptraj του AMBER. Η ανάλυση MM-PBSA όλων των συμπλοκών εκτελέστηκε όπως περιγράφεται σε προηγούμενες δημοσιεύσεις [204, 205].

3.2.4 Μεθοδολογία Φασματομετρίας μάζας

Για τον ιοντισμό και την ανίχνευση όλων των ενώσεων, χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο τριπλής και τετραπλής μάζας EVOQ Elite ER (Bruker) του εργαστηρίου του κύριου Θωμαΐδη σε λειτουργία ηλεκτροψεκασμού θετικού ιοντισμού (ESI+) χρησιμοποιώντας πολλαπλή παρακολούθηση αντίδρασης (MRM). Χρησιμοποιώντας τον πολλαπλό ανιχνευτή αντιδράσεων MRM (multiple reaction monitoring), ένα χαρακτηριστικό του λογισμικού MSWS της Bruker, οι βέλτιστες μεταβάσεις MRM που επιλέχθηκαν για παρακολούθηση των ενώσεων ήταν m/z 611,2 → 423,1 και 611,2 → 349,1 για CC, 441,2 → 147,2 και 441,2 → 255,1 για CAN 429,2 → 207,1 και 429,2 → 195,2 για IRB. Οι βέλτιστες συνθήκες ESI προσδιορίστηκαν ως εξής: τάση ψεκασμού 4500 V, θερμαινόμενη ροή αερίου καθετήρα 50 μονάδες, θερμαινόμενη θερμοκρασία ανιχνευτή 200 °C, ροή κωνικού αερίου 20 μονάδες, θερμοκρασία κώνου 350 °C, ροή αερίου εκνεφωτή 50 μονάδων και καυσαερίων. Ο συνολικός έλεγχος των LC και MS καθώς και η απόκτηση δεδομένων έγινε με το λογισμικό MSWS, έκδοση 8.2.1.

3.2.5 Προετοιμασία μητρικού διαλύματος και διαλύματος εργασίας

Τα μητρικά διαλύματα 1mg/mL για CC, CAN και ιριμπεσαρτάνη (IRB) παρασκευάστηκαν με διάλυση των κατάλληλων ποσοτήτων σε DMSO. Τα διαλύματα εργασίας που χρησιμοποιήθηκαν για τα πρότυπα καμπύλης βαθμονόμησης CC και CAN παρασκευάστηκαν με επιπρόσθετη αραιώση μητρικών διαλυμάτων με DMSO στις κατάλληλες συγκεντρώσεις. Το διάλυμα εργασίας IRB παρασκευάστηκε μέσω αραιώσης του μητρικού διαλύματος με DMSO στην κατάλληλη συγκέντρωση. Το μητρικό διάλυμα της CC,

συμπλοκοποιημένης με HP-β-CD παρασκευάστηκε με διάλυση της κατάλληλης ποσότητας του συμπλόκου σε νερό χρωματογραφικής καθαρότητας. Η επιθυμητή συγκέντρωση της CC σε ανθρώπινο πλάσμα, μετά από τον σχηματισμό του με το σύμπλοκο, παρασκευάστηκε με περαιτέρω αραίωση του αποθεματικού διαλύματος με νερό. Όλα τα διαλύματα αποθεμάτων και εργασίας αποθηκεύτηκαν στους -20 °C πριν από τη χρήση.

3.2.6 Δοκιμές σταθερότητας πλάσματος

Για να αξιολογηθεί η σταθερότητα του συμπλόκου CC και CC-HP-β-CD σε ανθρώπινο πλάσμα, 5 μl εκάστης ένωσης χωριστά, επωάστηκαν με 90 μl ανθρώπινου πλάσματος (pH ρυθμισμένο σε 7,4 με HCl) για 0, 24 και 48 ώρες σε υδρόλουτρο στους 37 °C. Προκειμένου να εξαληφθεί η δραστηριότητα των ενζύμων, 400 μl ακετονιτριλίου σε θερμοκρασία ψυχρού πάγου προστέθηκαν σε κάθε δείγμα μαζί με 5 μl διαλύματος εργασίας IRB, δίνοντας τελική συγκέντρωση 25 ng/mL για κάθε ένωση. Τα δείγματα αναμίχθηκαν με στροβιλισμό και αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο στους 4 °C για 2 ώρες. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 10.000 rpm για 5 λεπτά και το υπερκείμενο διηθήθηκε και μεταφέρθηκε σε φιαλίδια για ανάλυση UHPLC-MS/MS. Κάθε δείγμα μελετήθηκε εις τριπλούν και σχεδιάστηκε η γραφική παράσταση της συγκέντρωσης CC και CAN που υπολογίστηκε από τις καμπύλες βαθμονόμησης σε κάθε χρονικό σημείο, σε σχέση με τον χρόνο.

3.2.7 Καλλιέργεια και συλλογή κυττάρων, προετοιμασία της μεμβράνης

Τα εμβρυικά νεφρικά κύτταρα ανθρώπου (HEK 293), τα οποία ετερόλογα εκφράζουν τον ανθρώπινο υποδοχέα AT1, αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM/F12 (1:1) που περιέχει 3,15 g/L γλυκόζη, 10 % βόειο ορό μόσχου στους 37⁰ και 5% CO₂ και σε τρυβλία των 100mm. Την ημέρα του πειράματος τα κύτταρα (σε πληρότητα 90-100%) εκπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα (PBS 4,3 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 1,4 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7mM KCl, pH 7,2-7,3 σε θερμοκρασία δωματίου) και απομονώθηκαν μετά από κατεργασία τους για σύντομο χρονικό διάστημα με ρυθμιστικό διάλυμα PBS που περιείχε 2 mM EDTA (PBS/EDTA). Το κυτταρικό εναιώρημα που προέκυψε, φυγοκεντρήθηκε στις 1000 x g στροφές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, και το κυτταρικό

ίζημα που σχηματίστηκε επαναιωρήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα O (50 mM Tris-HCl που περιέχει 0.5 mM EDTA, 10% σουκρόζη, 10 mM MgCl₂, pH 7,4 σε 4 °C) και ομογενοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον ομογενοποιητή Janke & Kunkel IKA Ultra Turrax T25. Το ομογενοποίημα μεμβρανών φυγοκεντρήθηκε στις 250xg στροφές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε σε 16000xg για 10 λεπτά σε 4 °C. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα B (50 mM Tris - HCl που περιέχει 1 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 0,2% BSA, 0,2 mg/ml βακιτρακίνη (bacitracin), και 0,93 μg/ml απροτινίνη (aprotinin), pH 7,4 στους 4 °C) και το εναιώρημα μεμβρανών χρησιμοποιήθηκε για τις μελέτες δέσμησης.

3.2.8 Μελέτες δέσμησης

Τμήματα εναιωρήματος μεμβράνης (50 μL) επωάστηκαν σε σωληνάρια που περιείχαν ρυθμιστικό B και 90.000-110.000 cpm [¹²⁵I-Sar1-Ile8] AngII απουσία ή παρουσία αναλόγων σε συγκέντρωση 1000 nM ή σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις αυτών (ετερόλογος ανταγωνισμός πρόσδεσης) και σε τελικό όγκο των 0,15 mL. Τα μίγματα επωάστηκαν (1 ώρα, 24 °C) και στη συνέχεια διηθήθηκαν χρησιμοποιώντας συλλέκτη κυτάρων Brandel μέσω φίλτρων υάλου Whatman GF/C, προ-διαβραχθέντων επί 1 ώρα σε 0,5% πολυαιθυλενιμίνη (PEI, Poly(iminoethylene) κατά IUPAC) στους 4 °C. Οι ηθμοί εκπλύθηκαν 10 φορές με 1-2 mL παγωμένου 50 mM Tris-HCl που περιέχει NaCl 120 mM, pH 7,4 στους 4 °C. Η ραδιενέργεια των ηθμών προδιορίστηκε σε γ-μετρητή (LKB Wallac 1275 minigamma, απόδοση 80%). Η ποσότητα των μεμβρανών που χρησιμοποιήθηκαν προσαρμόστηκε για να εξασφαλιστεί ότι η ειδική δέσμηση ήταν πάντοτε ίση ή μικρότερη από 10% της συνολικής συγκέντρωσης του προστεθέντος ραδιοανιχνευτή. Η ειδική δέσμηση [¹²⁵I-Sar1-Ile8] AngII ορίστηκε ως η ολική δέσμηση στην οποία αφαιρέθηκε η μη-ειδική δέσμηση παρουσία 1000 nM Βαλσαρτάνης όπου λαμβάνει χώρα πλήρης κορεσμός του υποδοχέα. Τα πειραματικά δεδομένα αναλύθηκαν κάνοντας μη γραμμική ανάλυση με χρήση του λογισμικού Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) και προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των αναλόγων AngII που απαιτούνται για να εκτοπίσουν στο μισό (IC₅₀) τη ειδική δέσμηση της [¹²⁵I-Sar1-Ile8] AngII από τους υποδοχείς. Στη συνέχεια προδιορίστηκαν οι συγγένειες δέσμησης των ανάλογων AngII (τιμές K_i ή -logK_i) χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad

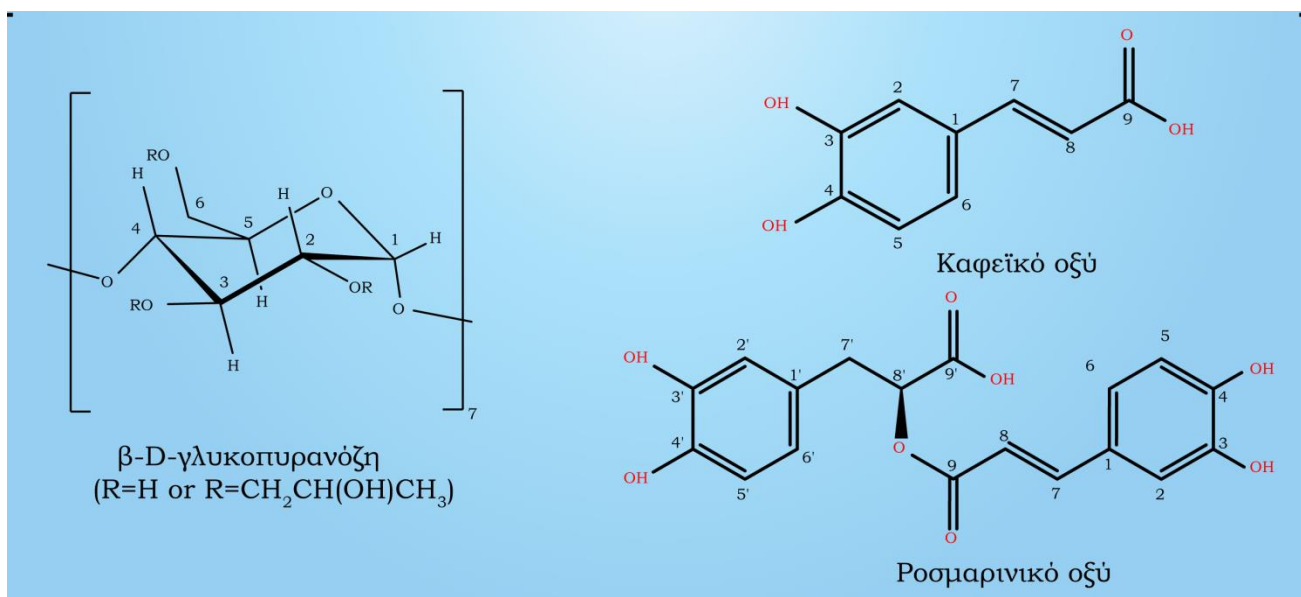
Prism 4.0 και την εξίσωση, $K_i = IC_{50}/(1+L/K_D)$, όπου το L εκφράζει τη συγκέντρωση της $^{125}\text{I-Sar1-Ile8}$ AngII [206]. Τα βιολογικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο του κύριου Λιαπάκη,

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Σύμπλοκα καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέως με την HP-β-CD

4.1 Εισαγωγή

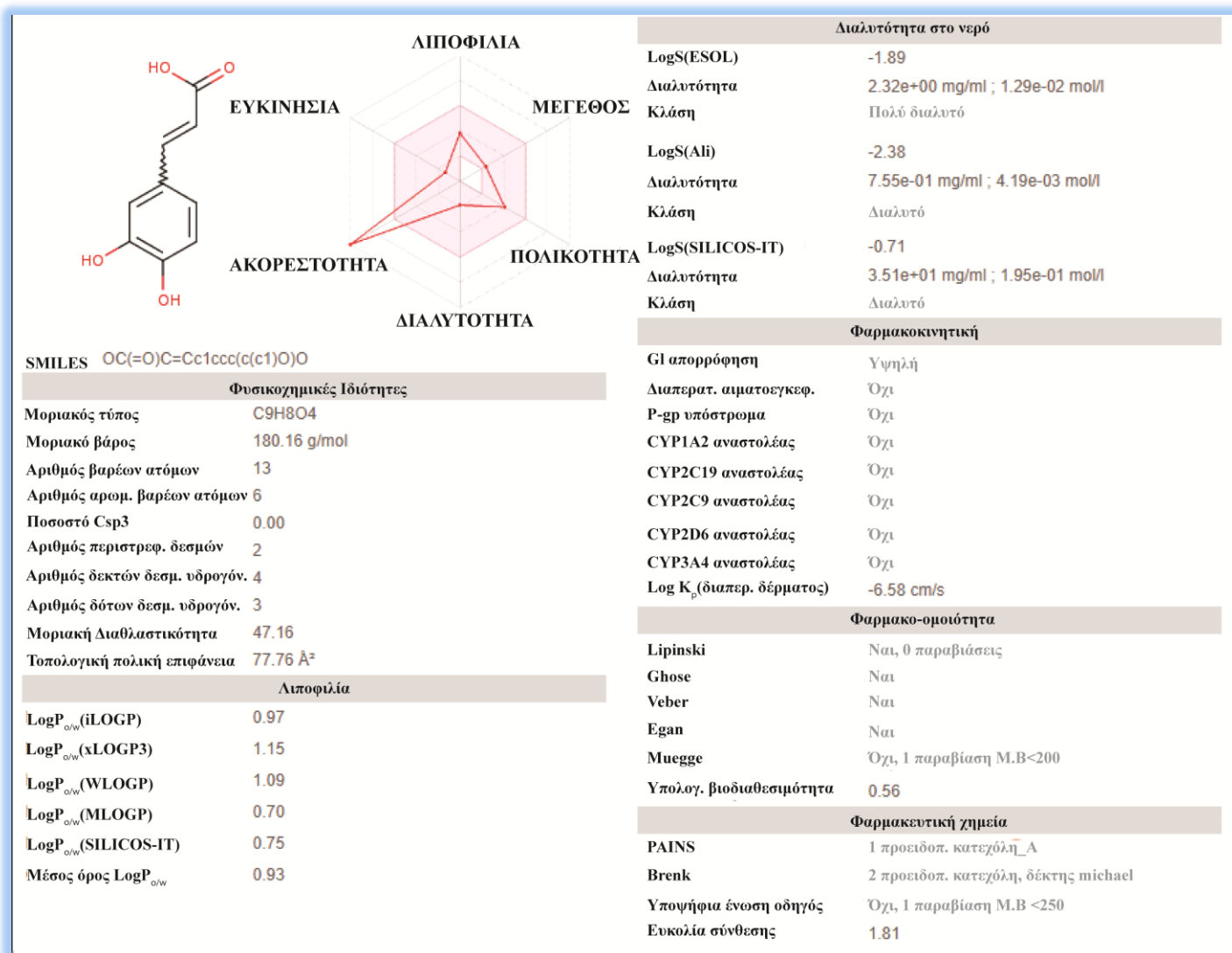
Παρά τις ευνοϊκές ιδιότητες που παρουσιάζουν οι φυσικές ενώσεις, στις περισσότερες περιπτώσεις υπάρχουν περιορισμένα οφέλη από την *in vivo* δράση τους. Αυτό συμβαίνει λόγω της μικρής εντερικής απορρόφησης και του μεταβολισμού, καθώς επίσης συνήθως λαμβάνονται σε μεγάλες δόσεις προκειμένου να επιτευχθεί η θεραπευτική συγκέντρωση στο πλάσμα, το οποίο αναπόφευκτα οδηγεί σε ανεπιθύμητες παρενέργειες [207-209]. Το καφεϊκό και το ροσμαρινικό οξύ (Σχήμα 23) επίσης είναι ενώσεις που περιέχουν αρκετές υδροξυλομάδες και είναι πιθανό να είναι γλυκουρονιδωμένες ή θειωμένες στα εντερικά κύτταρα, μορφές που γενικά θεωρούνται ότι είναι λιγότερο δραστικές από τις μητρικές ενώσεις [210].



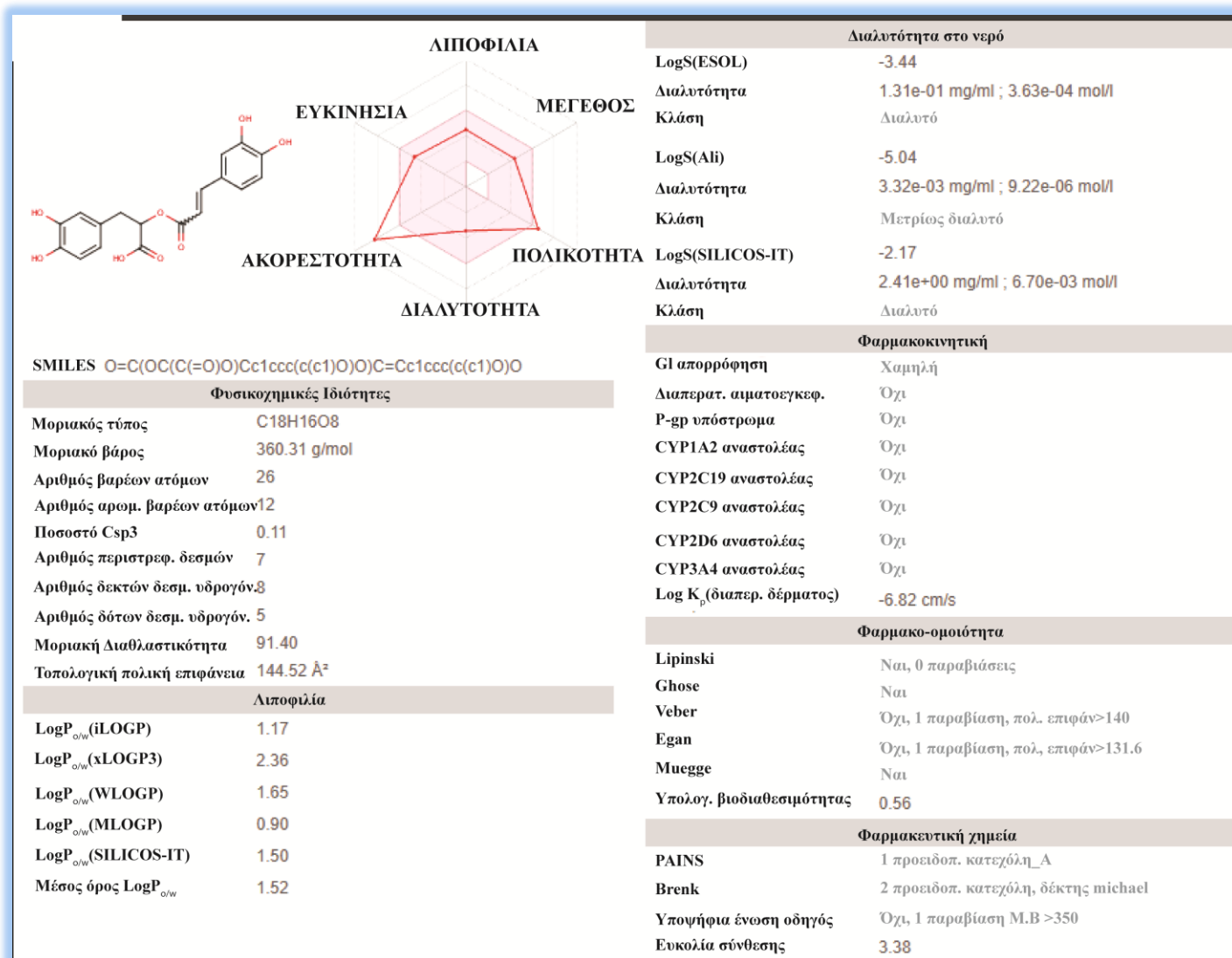
Σχήμα 23 Δομική μονάδα της HP-β-CD αποτελούμενης από επτά μονάδες β-D-γλυκοπυρανόζης (αριστερά). Δομές του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος (δεξιά).

Το καφεϊκό οξύ ειδικότερα αποδείχθηκε ότι δεν είχε επιθυμητή διαπερατότητα στη μονοστιβάδα κυττάρων Caco-2 και ήταν εύκολο να αποβληθεί από το επιθηλιακό τοίχωμα του εντέρου [211]. Ο εγκλεισμός σε κυκλοδεξτρίνες είναι

ένας εναλλακτικός τρόπος προστασίας των φυσικών αυτών προϊόντων με ταυτόχρονη αύξηση της διαλυτότητας και της βιοδιαθεσιμότητάς τους. Οι υπολογιζόμενες ιδιότητες τους παρουσιάζονται στα σχήματα 24 και 25 όπως αντλήθηκαν από τον διαδικτυακό χώρο <http://www.swissadme.ch> [212].



Σχήμα 24 In silico υπολογισθείσες φυσικοχημικές ιδιότητες, λιποφιλίας, φαρμακο-ομοιότητας, φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές του καφεϊκού οξέος σύμφωνα με τη δομή του [212].



Σχήμα 25 In silico υπολογισθείσες φυσικοχημικές ιδιότητες, λιποφιλίας, φαρμακο-ομοιότητας, φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές του ροσμαρινικού οξέος σύμφωνα με τη δομή του [212].

Τα σημαντικότερα αποτελέσματα που προκύπτουν όσον αφορά τα μειονεκτήματα του καφεϊκού και ροσμαρινικού οξέος είναι:

α) Η ακορεστότητα είναι εκτός των επιθυμητών οξυγόνων.

β) Δίνουν μια προειδοποίηση PAINS (Pan Assay Interference Compounds) και δύο Brenk διότι η δομή κατεχόλης που διαθέτουν μπορεί να μετατραπεί σε κινουειδές (quinoid) μέσω οξειδοαναγωγής και να δεσμεύσει άτομα μετάλλων [213].

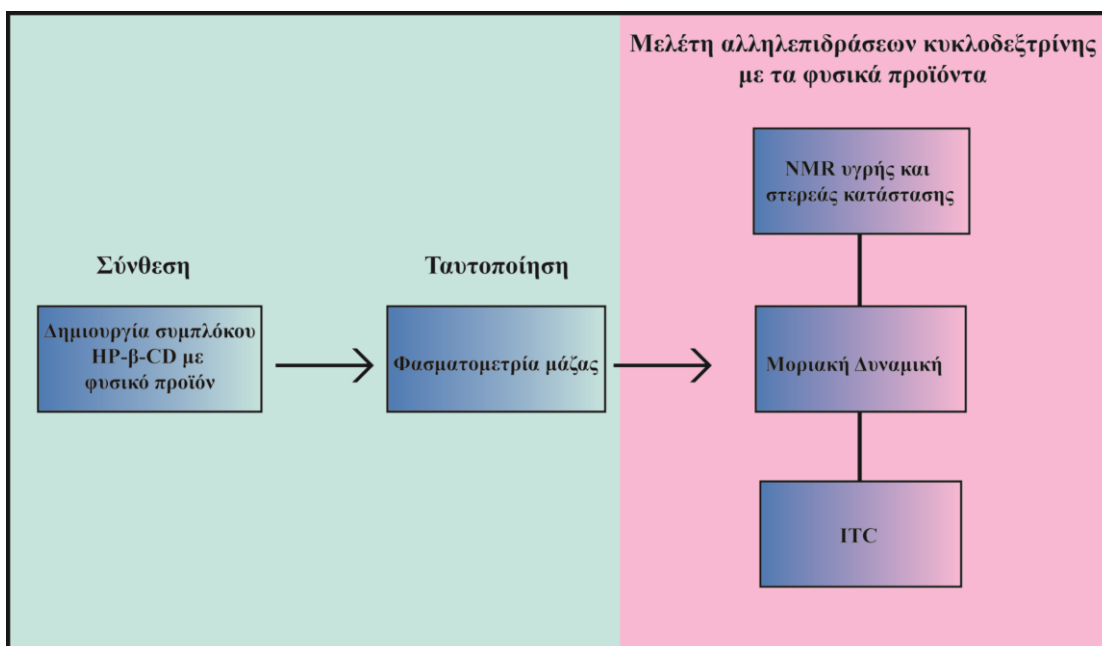
γ) Δεν μπορούν να αποτελέσουν ενώσεις οδηγούς γιατί MB<250 στην περίπτωση του καφεϊκού οξέος και MB>350 για το ροσμαρινικό οξύ.

4.2 Στόχος του κεφαλαίου

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζεται η ταυτοποίηση των συμπλόκων HP-β-CD με τα φυσικά προϊόντα καφεϊκό και ροσμαρινικό οξύ και η μελέτη των αλληλεπιδράσεων τους (Σχήμα 26). Συγκεκριμένα, αναλύονται δομικές και θερμοδυναμικές παράμετροι των συμπλόκων CA-HP-β-CD και RA-HP-β-CD με σκοπό την

- απόδειξη ικανότητας συμπλοκοποίησης
- αποσαφήνιση της δομής του συμπλόκου
- εξεύρεση του βέλτιστου αριθμού υποκατάστασης της HP-β-CD

Πολλά φαρμακευτικά προϊόντα αποτελούν παράγωγα φυσικών προϊόντων. Ο λόγος που απαιτείται η συνθετική μετατροπή της δομής των φυσικών προϊόντων τα οποία απομονώνονται από τις φυσικές πηγές είναι ότι συνήθως είναι δυσδιάλυτες ή αρκετά λιπόφιλες.

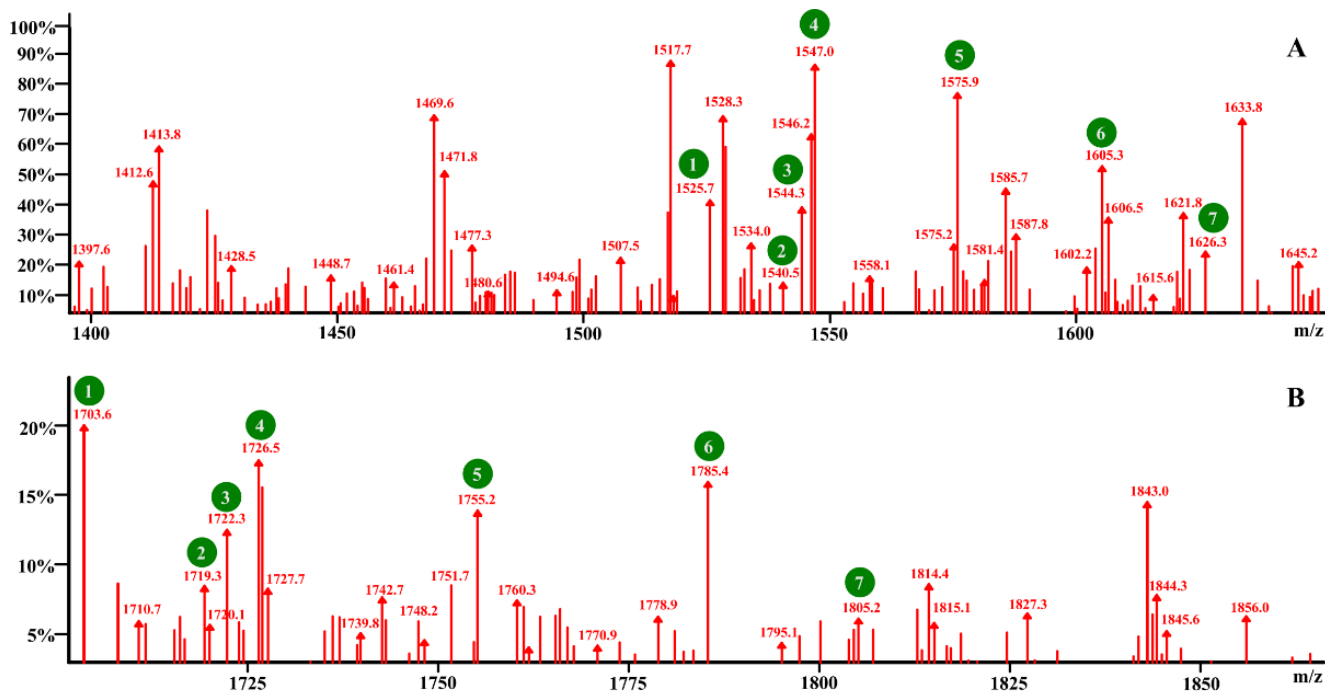


Σχήμα 26 Διάγραμμα εργασιών για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων κυκλοδεξτρίνης με τα φυσικά προϊόντα. Η σύνθεση των συμπλόκων παρουσιάζεται στο κεφάλαιο 3 (Υλικά και μέθοδοι).

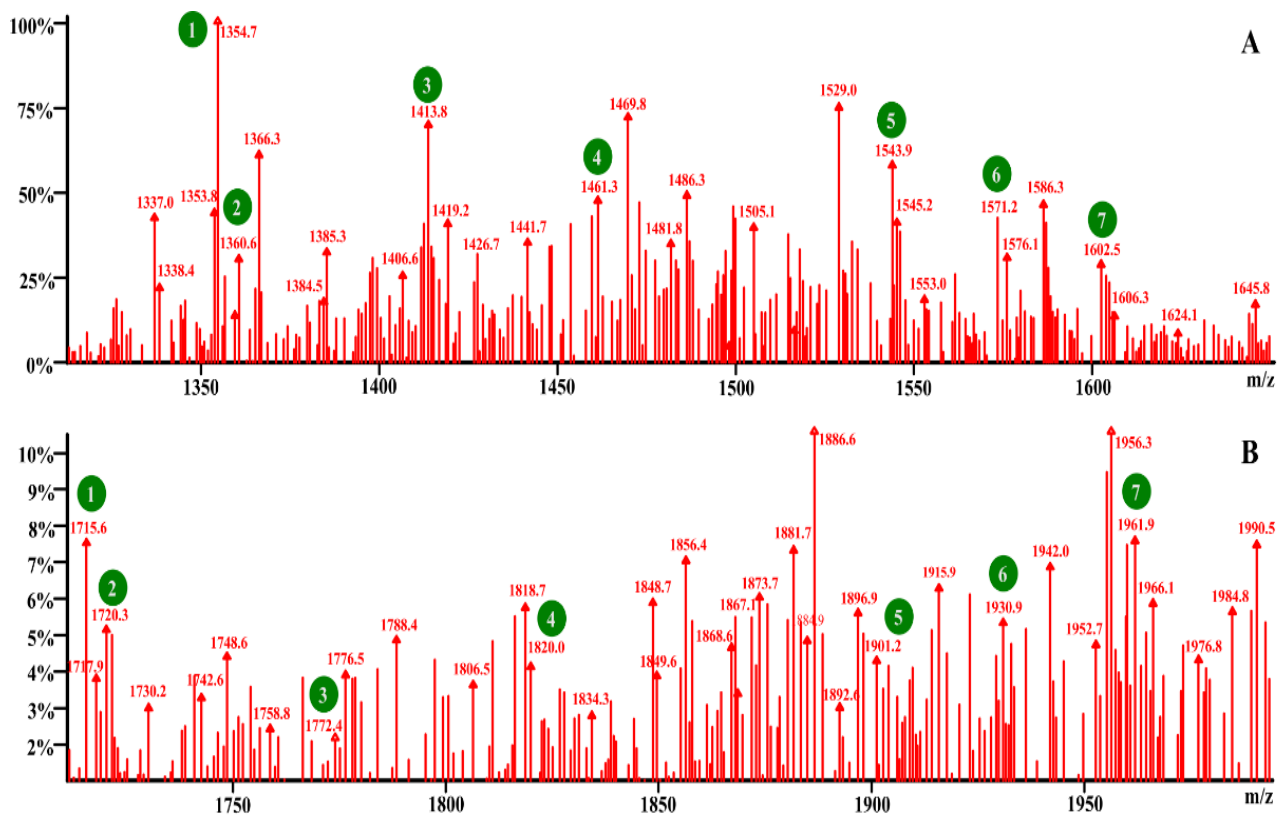
4.3 Πειραματικό μέρος

4.3.1 Φασματομετρία μάζας

Η φασματομετρία μάζας ESI με λειτουργία πλήρους σάρωσης χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό των δύο συμπλόκων. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική αυτή προηγουμένως για τον εντοπισμό ασθενών μη ομοιοπολικών διαμοριακών αλληλεπιδράσεων της HP-β-CD με την ιριμπεσαρτάνη [214]. Τα φάσματα λήφθηκαν στο πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Το Σχήμα 27A απεικονίζει την περιοχή του φάσματος μάζας της HP-β-CD από το φάσμα του συμπλόκου CA-HP-β-CD. Σύμφωνα με το σχήμα υπάρχει ετερογένεια στην HP-β-CD αφού δεν είναι ένα συγκεκριμένο μόριο αλλά αποτελείται από ένα μίγμα διαφορετικών υποκαταστάσεων. Στο Σχήμα 27B απεικονίζεται το φάσμα μάζας του συμπλόκου CA-HP-β-CD. Οι τιμές m/z του CA-HP-β-CD εντοπίζονται μεταξύ 1700 και 1900 όπου μπορούν να παρατηρηθούν αρκετές κορυφές (1703,6 , 1719,3 , 1722,3 , 1726,5 , 1755,2 , 1785,4 και 1805,2). Αυτές οι συγκεκριμένες τιμές σχετίζονται άμεσα με τις τιμές (1525,7 , 1540,5 , 1544,3 , 1547,0 , 1575,9 , 1605,3 και 1626,3) της HP-β-CD και υπονοούν 7 τύπους συμπλόκων με 1:1 στοιχειομετρία (ανάλογα με τον βαθμό υποκατάστασης της κυκλοδεξτρίνης). Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώνει τον σχηματισμό ενός σταθερού συμπλόκου που αναπτύσσεται μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και συμφωνεί με τα αποτελέσματα των συμπληρωματικών τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν, όπως επίσης και με τα αποτελέσματα από παρόμοιο σύμπλοκο που μελετήθηκε από την ίδια ερευνητική ομάδα [214]. Αντίστοιχα, για το σύμπλοκο RA-HP-β-CD, στην περιοχή 1300-1600 m/z όπου βρίσκεται η HP-β-CD (Σχήμα 28A), προσδιορίστηκαν επτά κορυφές (1354,7 , 1360,6 , 1413,8 , 1461,3 , 1543,9 , 1571,2 και 1602,5) που υποδηλώνουν ότι υπάρχει μίγμα διαφορετικών υποκαταστάσεων της HP-β-CD. Στην περιοχή 1700-2000 m/z (Σχήμα 28B), όπου βρίσκεται το σύμπλοκο RA-HP-β-CD, οι επτά αντίστοιχες κορυφές είναι (1715,6 , 1720,3 , 1772,4 , 1820 , 1901,2 , 1930,9 και 1961,9) που επίσης δείχνουν τον σχηματισμό ενός συμπλόκου 1:1. Λόγω μικρής διακριτικής ικανότητας του οργάνου δεν πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των θραυσμάτων της διαφορετικά υποκατεστημένης κυκλοδεξτρίνης όπως στην περίπτωση της CAN και της CC.



Σχήμα 27 Μεγθύνσεις περιοχών του φάσματος ESI-MS σε λειτουργία αρνητικού ιόντος για το σύμπλοκο CA-HP-β-CD όπου απεικονίζονται οι περιοχές κορυφής των (A) HP-β-CD και (B) CA-HP-β-CD.



Σχήμα 28 Μεγθύνσεις περιοχών του φάσματος ESI-MS σε λειτουργία αρνητικού ιόντος για το σύμπλοκο RA-HP-β-CD όπου απεικονίζονται οι κορυφές των (A) HP-β-CD και (B) RA-HP-β-CD.

4.3.2 Φάσματα ^{13}C CP-MAS NMR.

Η ανάλυση του υψηλής διαχωριστικότητας φάσματος ^{13}C CP-MAS NMR στερεάς κατάστασης του συμπλόκου CA-HP-β-CD εμφάνισε αποκλίσεις χημικών μετατοπίσεων ειδικά στους άνθρακες C1, C3, C4 και C6 που ανήκουν στην αρωματική περιοχή του καφεϊκού οξέος καθώς και διευρύνσεις των κορυφών (Πίνακας 6).

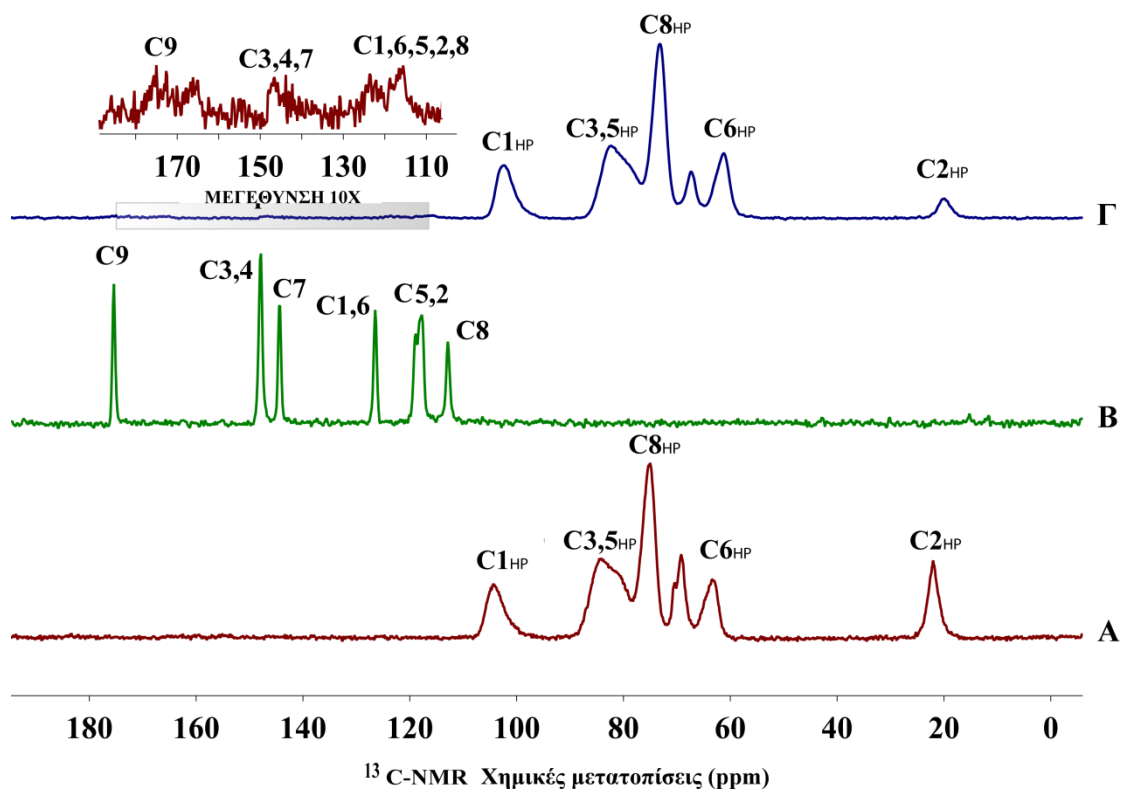
Η διεύρυνση των κορυφών ^{13}C CP-MAS NMR, αποτελεί ένδειξη συμπλοκοποίησης, όπως και το Δ ppm των προαναφερθέντων ατόμων άνθρακα οδηγεί σ' ένα προτεινόμενο σύμπλοκο όπου η αρωματική περιοχή ενθυλακώνεται στο HP-β-CD (Σχήμα 29). Αυτές οι πληροφορίες ελήφθησαν υπόψη για τη δημιουργία των αρχικών δομών στις προσομοιώσεις MD.

Πίνακας 6 ^{13}C -NMR χημικές μετατοπίσεις του CA στην βιβλιογραφία και όπως μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή (^{13}C -CP-MAS σε 150MHz). Σύγκριση με το συμπλοκοποιημένο σε HP-β-CD.

| Αριθμός Ανθράκων του CA | ^{13}C -NMR (100MHz, CD_3OD , 243K) [176] | ^{13}C CP-MAS (100.13 MHz) [215] | ^{13}C -NMR(75MHz, DMSO-d_6) [216] | ^{13}C -CP-MAS (150MHz, 310K) | ^{13}C -CP-MAS CA συμπλεγμένο με τη HP-β-CD(150MHz, 310K) | Δ δppm (^{13}C CP-MAS) |
|-------------------------|--|---|---|--|--|---|
| 1 | 127,8 | 125,3 | 125,8 | 126,4 | 123,6 | 2,8 |
| 2 | 114,8 | 108,5 | 115,2 | 117,7 | Nr | Nr |
| 3 | 147,0 | 147,8 | 145,6 | 147,8 | 145,9 | 1,9 |
| 4 | 149,8 | 148,8 | 148,2 | 147,8 | 146,5 | 1,3 |
| 5 | 116,7 | 114,1 | 115,8 | 118,8 | Nr | Nr |
| 6 | 123,0 | 126,2 | 121,2 | 126,4 | 123,6 | 2,8 |
| 7 | Δεν αναφέρεται | 144,8 | 144,6 | 144,3 | 143,6 | 0,7 |
| 8 | Δεν αναφέρεται | 111,7 | 114,7 | 112,8 | Nr | Nr |
| 9 | 171,4 | 172,9 | 168,0 | 175,4 | 175,2 | 0,2 |

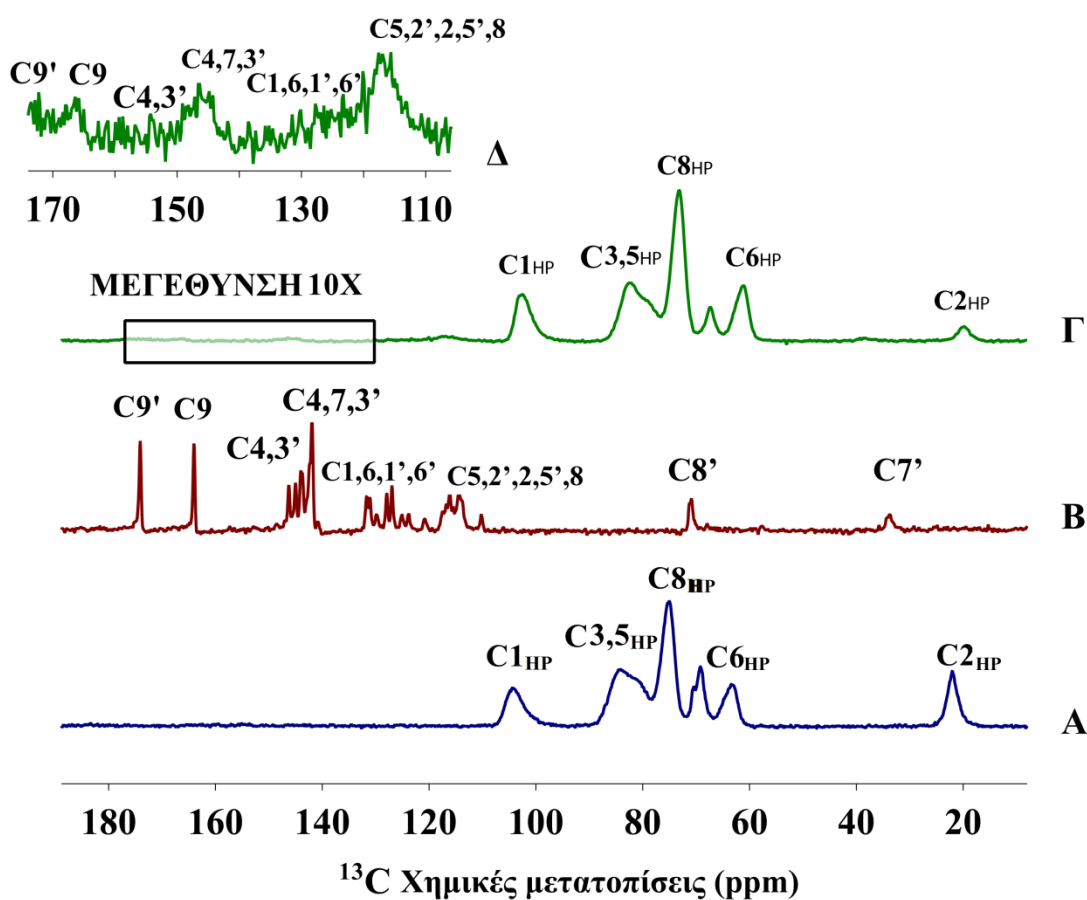
nr= δεν διακρίνεται

Σε αντίθεση με την αρωματική περιοχή του CA οι κορυφές της HP-β-CD δεν υφίστανται διευρύνσεις. Εξαίρεση αποτελεί η C_{2HP} η οποία διευρύνεται σημαντικά.



Σχήμα 29 Φάσματα ^{13}C -CP/MAS του (Α) HP-β-CD, (Β) καφεϊκού οξέος συμπλοκοποιημένου με την HP-β-CD (Γ) της αρωματικής περιοχής.

Το φάσμα ^{13}C CP/MAS του συμπλόκου HP-β-CD/ροσμαρινικού οξέος έδειξε ότι οι γνωστές κορυφές της HP-β-CD μετατοπίστηκαν σε περισσότερο προασπισμένες περιοχές (upfield) (Πίνακας 7). Οι αρωματικές κορυφές του RA έχουν διευρυνθεί σημαντικά (Σχήμα 30) όπως στην περίπτωση του CA και αντίστοιχα με παρόμοιες περιπτώσεις στη βιβλιογραφία [217]. Αυτή είναι μια ένδειξη ότι το RA είναι συμπλοκοποιημένο με την HP-β-CD εντός του υδρόφοβου τμήματος της HP-β-CD. Η προάσπιση των υδρογόνων της υδρόφοβης κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης επάγεται από την μαγνητική ανισοτροπία που δημιουργείται κατά τον εγκλεισμο μιας ομάδας πλούσιας σε π-ηλεκτρόνια [218]. Τέτοιες ομάδες μπορεί να είναι φαινύλια, τριαζολικοί ή τετραζολικοί δακτύλιοι.



Σχήμα 30 Φάσματα ^{13}C -NMR του (Α) HP-β-CD, (Β) ροσμαρινικού οξέος (Γ) του συμπλόκου ροσμαρινικού οξέος με HP-β-CD, (Δ) και της μεγέθυνσης της αρωματικής περιοχής. Τόσο η ελεύθερη όσο και η συμπλοκοποιημένη κυκλοδεξτρίνη μεγεθύνθηκαν 10 φορές. Η αρωματική περιοχή (D) του συμπλόκου μεγεθύνθηκε 10 φορές.

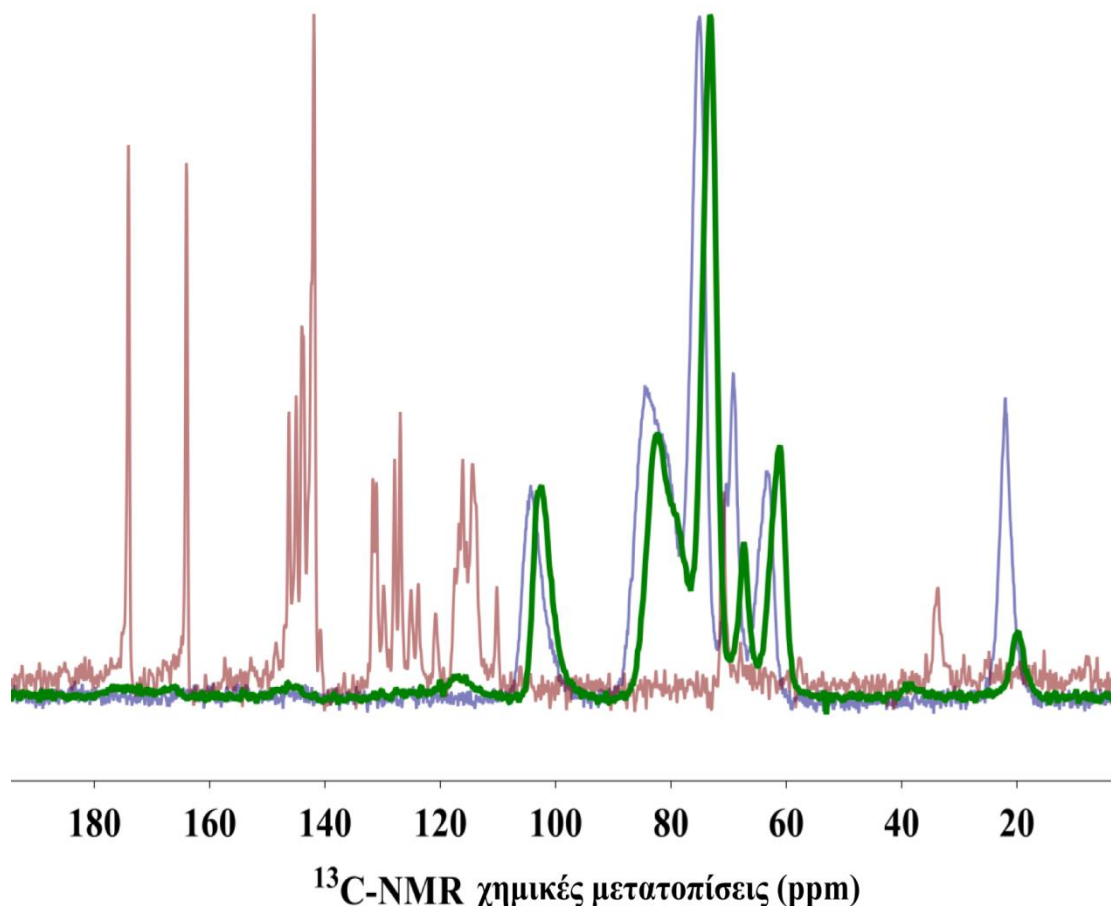
Σε αντίθεση με την αρωματική περιοχή του RA οι κορυφές της HP-β-CD δεν υφίστανται σημαντικές μεταβολές. Εξάιρεση αποτελεί η C2_{HP} η οποία διευρύνεται σημαντικά

Η μείωση της ευκινησίας δεν είναι ειδική για κάποιο συγκριμένο δομικό τμήμα, καθώς όλες οι κορυφές που αποδίδονται στο ροσμαρινικό οξύ εμφανίζονται με σημαντική διεύρυνση (Σχήματα 30,31). Το αποτέλεσμα αυτό δεν συμφωνεί με εκείνο που δημοσιεύτηκε από τους *Medronho et al* [219], όπου μόνο ένα μέρος του μορίου φιλοξενείται στην HP-β-CD. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διεύρυνση και το Δδ (Πίνακας 7) του C7' (39,0 ppm). Είναι αρκετά πιθανό λοιπόν

ότι στη στερεά κατάσταση το ροσμαρινικό οξύ συμπεριφέρεται διαφορετικά από το διάλυμα.

Πίνακας 7 ^{13}C -NMR χημικές μετατοπίσεις του ροσμαρινικού οξέος στη βιβλιογραφία. Σύγκριση με το συμπλοκοποιημένο με HP- β -CD.

| Αριθμός ανθράκων του RA | ^{13}C -NMR (125MHz DMSO- d_6 ,313K) [220] | ^{13}C -NMR (125MHz DMSO- d_6) [221] | ^{13}C -CP-MAS(150MHz,310K) | ^{13}C -CP-MAS RA συμπλοκοποιημένο με HP- β -CD (150MHz,310K) |
|--------------------------------|---|--|--------------------------------------|--|
| 1 | 125,9 | 126,2 | 126,9 | 109-135 |
| 2 | 115,4 | 115,7 | 115,9 | 109-135 |
| 3 | 146,1 | 144,9 | 142,0 | 139-154 |
| 4 | 149,1 | 145,8 | 145,2 | 139-154 |
| 5 | 116,3 | 116,6 | 116,1 | 109-135 |
| 6 | 122,0 | 122,5 | 123,7 | 109-135 |
| 7 | 146,4 | 146,7 | 143,8 | 139-154 |
| 8 | 113,8 | 114,1 | 114,2 | 109-135 |
| 9 | 166,4 | 166,8 | 164,0 | 164-183 |
| 1' | 127,8 | 128,3 | 131,1 | 109-135 |
| 2' | 117,2 | 117,6 | 116,1 | 109-135 |
| 3' | 145,4 | 149,5 | 145,2 | 139-154 |
| 4' | 144,5 | 146,5 | 143,9 | 139-154 |
| 5' | 115,9 | 116,2 | 114,3 | 109-135 |
| 6' | 120,5 | 120,9 | 120,7 | 109-135 |
| 7' | 36,6 | 37,0 | 33,7 | 36,4 |
| 8' | 73,3 | 73,8 | 70,9 | 73,2 |
| 9' | 171,3 | 171,8 | 174,0 | 164-183 |

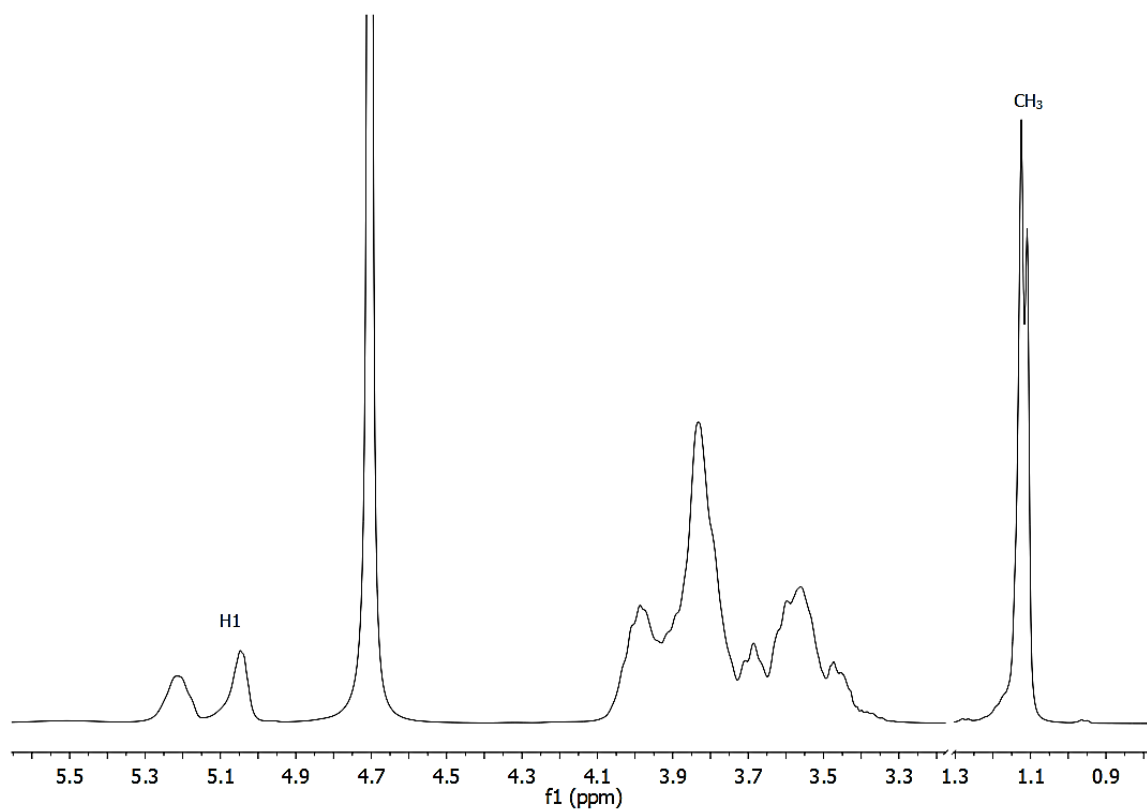


Σχήμα 31 Υπέρθυση φασμάτων *Μπλε* HP-β-CD *Κόκκινο* RA και *Πράσινο* Σύμπλοκο RA με HP-β-CD. Παρατηρείται ότι το φάσμα του συμπλόκου μετατοπίζεται σε υψηλότερα προασπισμένες περιοχές όπως αναμενόταν.

4.3.3 Φάσματα υψηλής διακριτικής ικανότητας σε υγρή κατάσταση

Φασματοσκοπική Ανάλυση της HP-β-CD με χρήση ομοπυρηνικής και ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού μίας και δύο διαστάσεων:

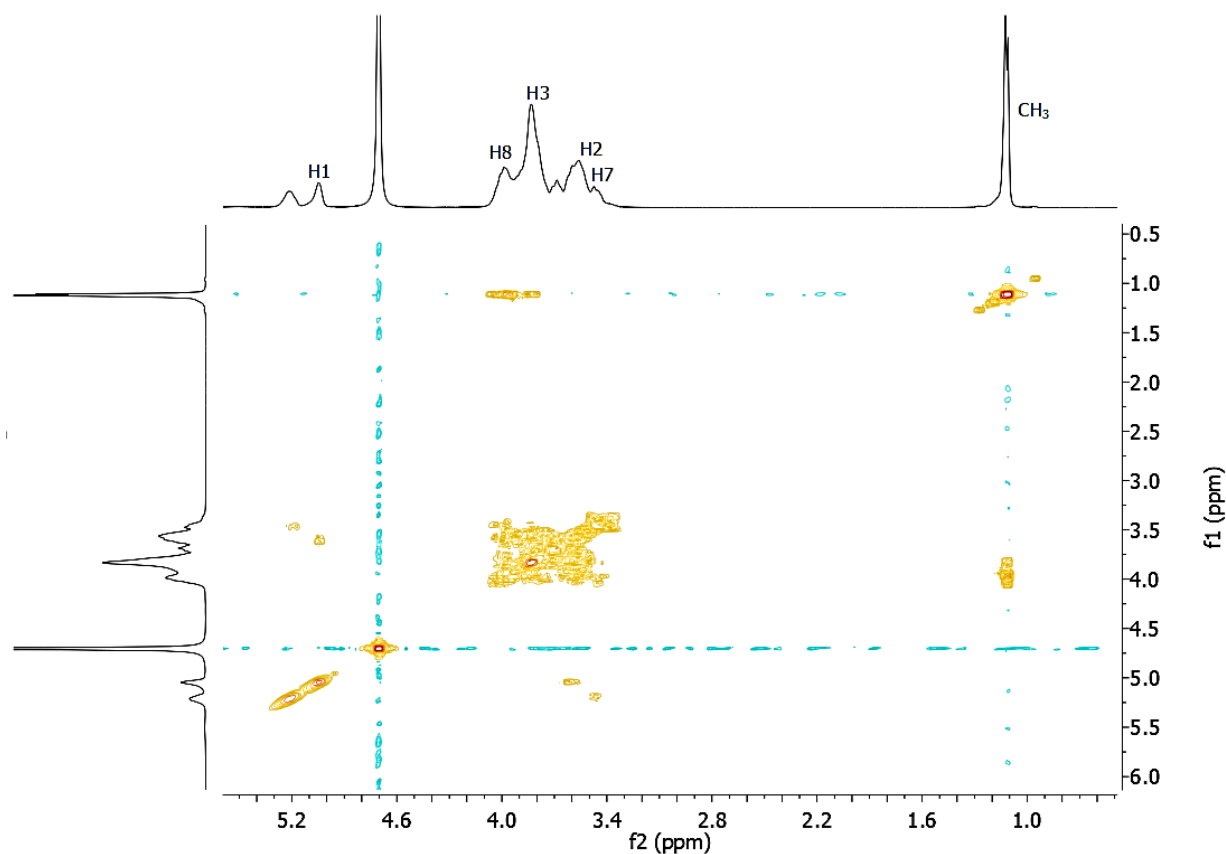
Στο Σχήμα 32 εμφανίζεται το φάσμα ^1H NMR της HP-β-CD. Διακριτές κορυφές οι οποίες είναι ήδη γνωστές από τη βιβλιογραφία [121] είναι αυτές που αντιστοιχούν στο ανωμερικό πρωτόνιο H-1 και τη μεθυλομάδα. Αυτές συντονίζονται στα 5,06-5,23 ppm και 1,14 ppm αντίστοιχα.



Σχήμα 32 Φάσμα 1H NMR της HP-β-CD σε D₂O σε θερμοκρασία δωματίου.

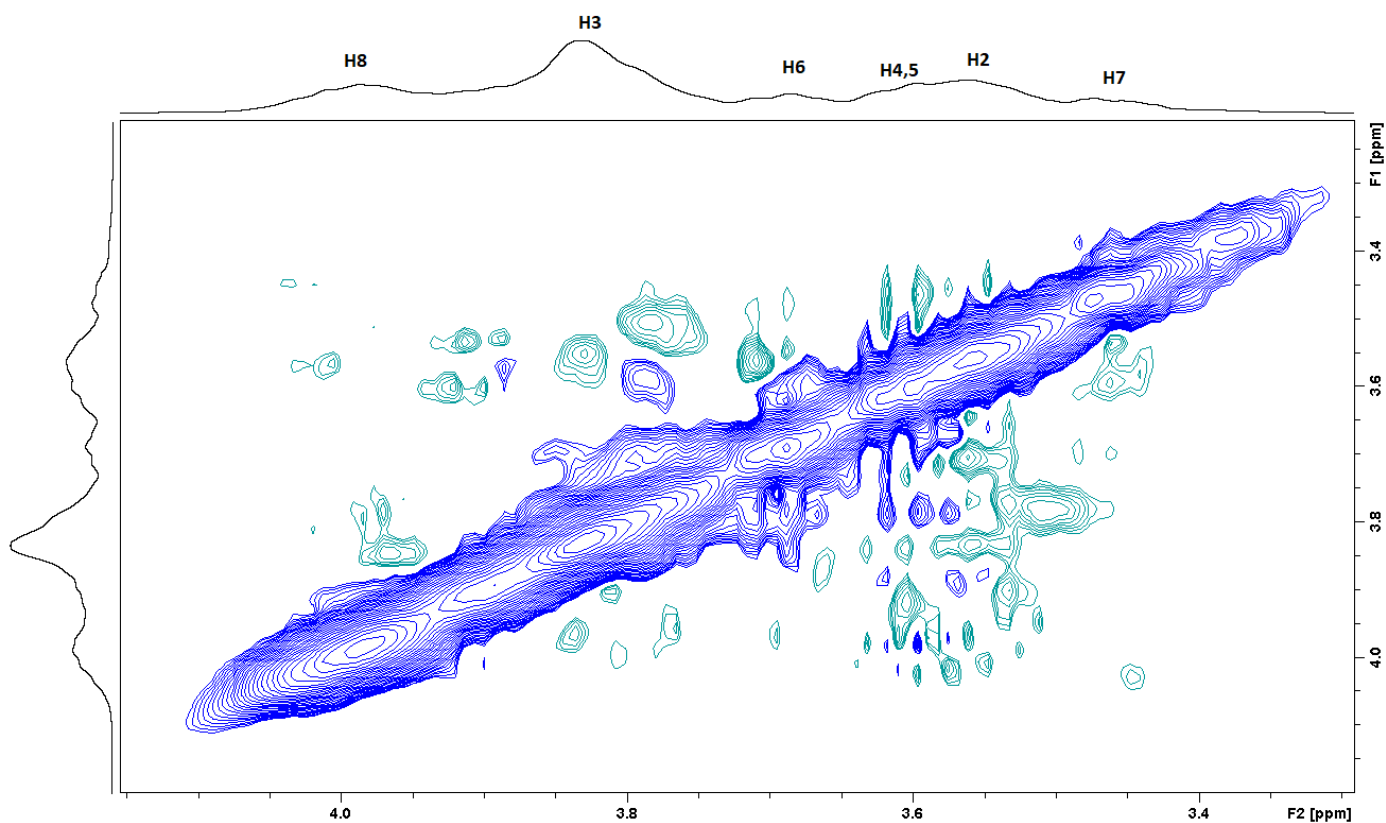
Οι ολοκληρώσεις των κορυφών των ανωμερικών H1 (7) και CH₃ (17,7) δίνουν βαθμό υποκατάστασης 2-υδροξυπροπυλο DS=6 επειδή το ολοκλήρωμα εάν διαιρεθεί με το αριθμό πρωτονίων της μεθυλομάδας προκύπτει $17,7/3 \approx 6$.

Στο Σχήμα 33 εμφανίζεται το φάσμα 2D COSY της HP-β-CD. Το H1 σχετίζεται μέσω δεσμού με το H2 και αυτό με τη σειρά του με το H3. Η μεθυλομάδα σχετίζεται μέσω δεσμού με το H8 και αυτό με το H7.



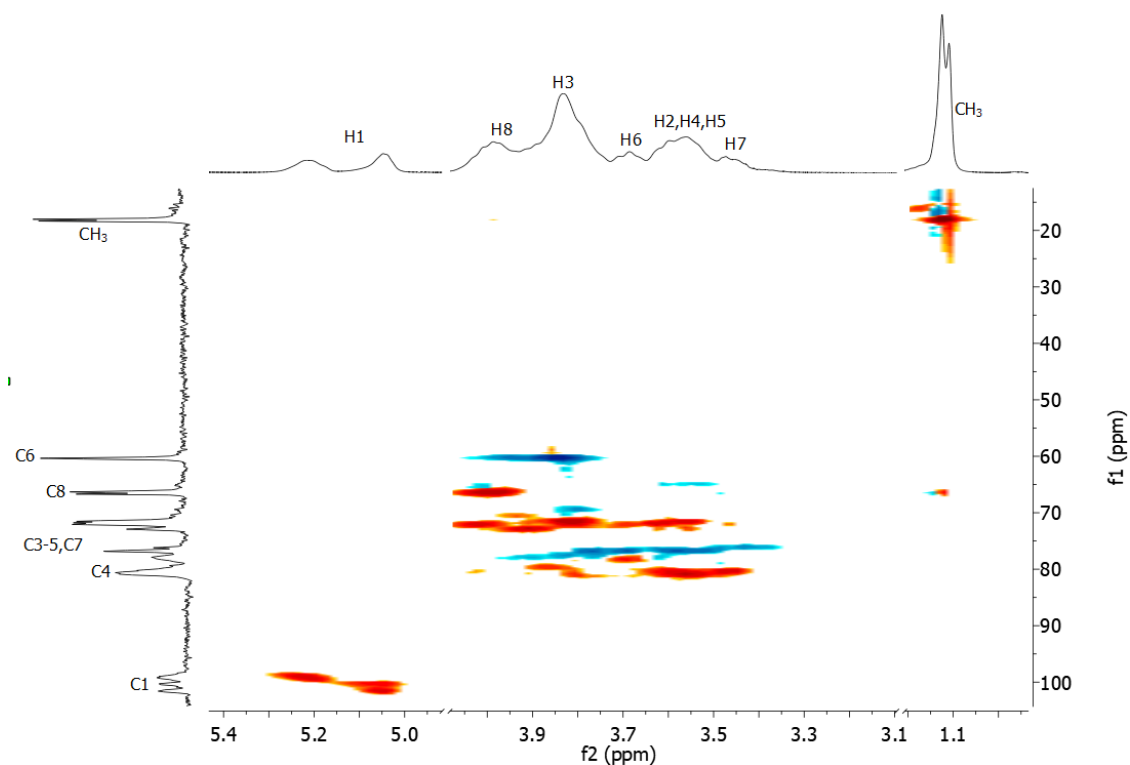
Σχήμα 33 Φάσμα 2D NMR COSY της HP-β-CD σε D₂O σε θερμοκρασία δωματίου. Στο φάσμα είναι εμφανείς οι συσχετισμοί μέσω δεσμού των CH₃-H₈, H₈-H₇, H₁-H₂ και H₂-H₃.

Εκτελέστηκε το φάσμα 2D NOESY (Σχήμα 34) με την ελπίδα ότι αυτό ίσως θα βοηθούσε στην ταυτοποίηση περαιτέρω πρωτονίων. Πράγματι οι διάφοροι συσχετισμοί στον χώρο όπως H₆-H₄, H₆-H₃, H₇-H₃ οδήγησαν και στην ταυτοποίηση των H₄-H₆.



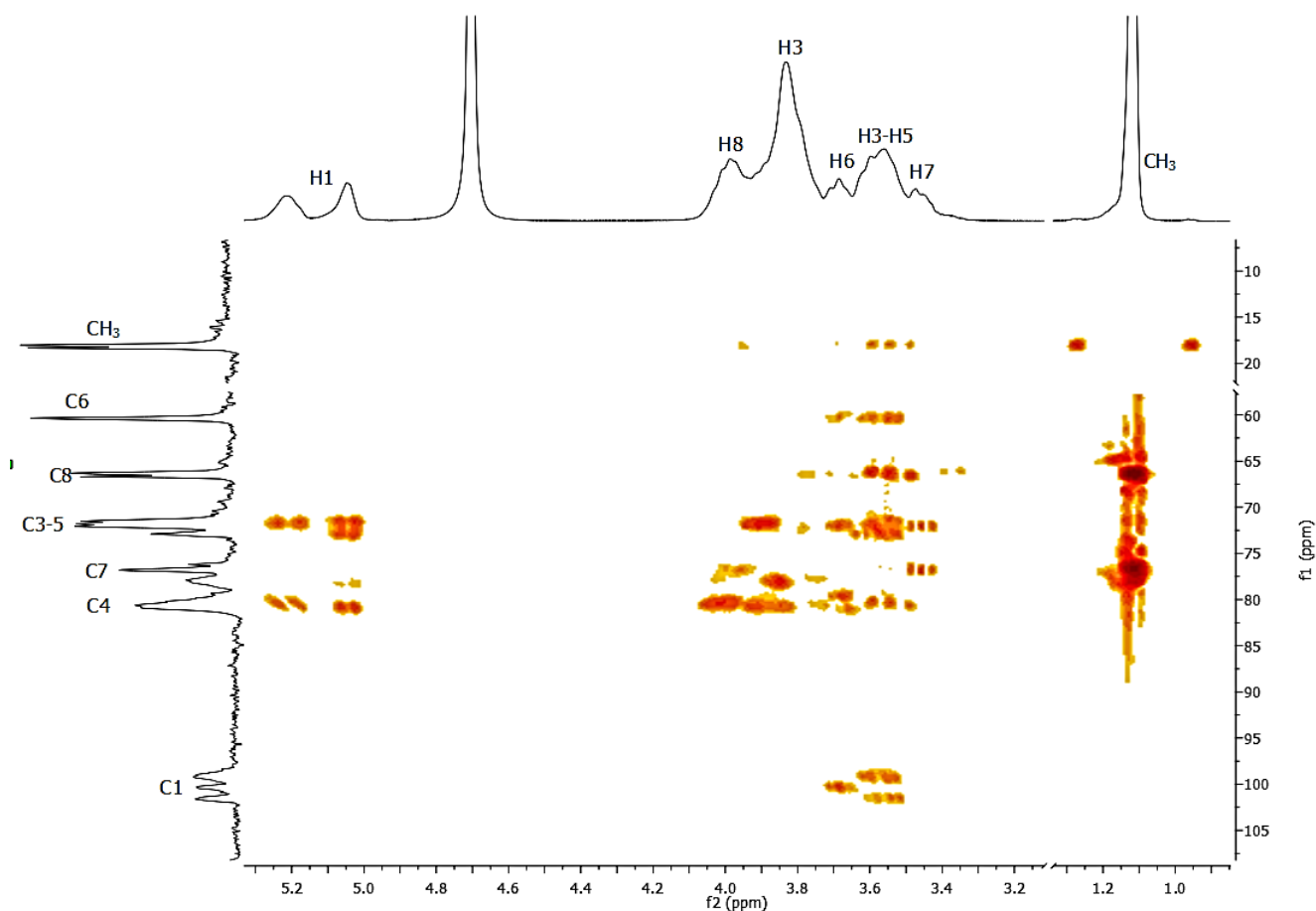
Σχήμα 34 Φάσμα 2D NMR ROESY της HP-β-CD σε D₂O σε θερμοκρασία δωματίου.

Το 2D HSQC επιτρέπει την ταυτοποίηση των αντίστοιχων ανθράκων που φέρουν πρωτόνια (Σχήμα 35). Το μόριο δεν φέρει τεταρτοταγείς άνθρακες και επομένως το πείραμα αυτό είναι και το πιο κρίσιμο.



Σχήμα 35 Φάσμα 2D NMR HSQC της HP-β-CD σε D₂O σε θερμοκρασία δωματίου.

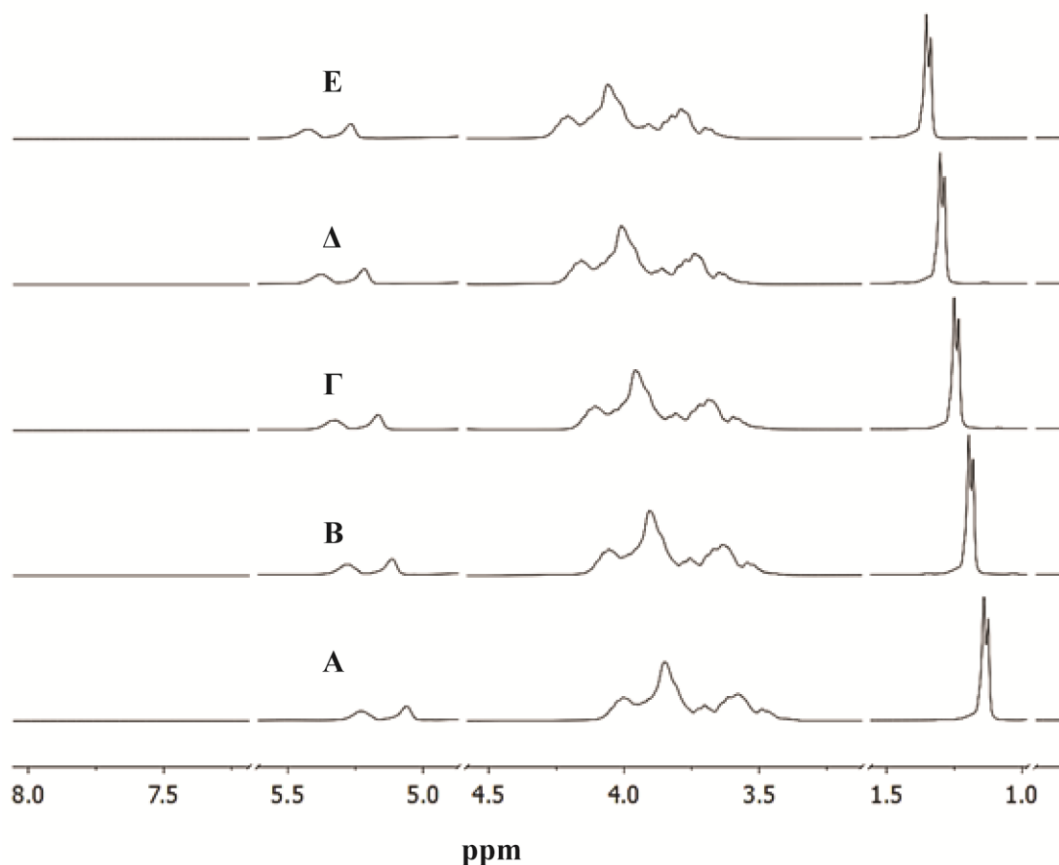
Το 2D-HMBC επιτρέπει τη διαφοροποίηση του C7. Τα C3-C5 όπως και τα H3-H5 δεν είναι δυνατό να ταυτοποιηθούν με το πείραμα αυτό (Σχήμα 36). Η μεγάλη διαπλάτυση των κορυφών επισημαίνει το πρόβλημα της ισομέρειας. Τα διάφορα πρωτόνια με διαφορετικό DS αλληλεπικαλύπτονται στις χημικές μετατοπίσεις με αποτέλεσμα η ταυτοποίησή τους να καθίσταται αδύνατη.



Σχήμα 36 Φάσμα 2D NMR HMBC της HP-β-CD σε D₂O σε θερμοκρασία δωματίου.

Προσπαθήσαμε επίσης να εκτελέσουμε πειράματα της HP-β-CD σε D₂O στο θερμοκρασιακό εύρος 30-50 °C (Σχήμα 37). Δεν παρατηρήθηκε βελτίωση στη διακριτική ικανότητα των κορυφών μέχρι τη θερμοκρασία αυτή που σημαίνει ότι δεν μπορεί να επιτευχθεί βελτίωση στην ταυτοποίηση των κορυφών. Πιθανά η χρήση φασματογράφου ο οποίος συντονίζεται σε μεγαλύτερο μαγνητικό πεδίο να βελτιώσει την ταυτοποίηση χωρίς όμως αυτό να είναι βέβαιο λόγω των διαφόρων DS που υπάρχουν στην HP-β-CD όπως τονίσθηκε πιο πάνω. Η μόνη παρατήρηση στα φάσματα που ελήφθησαν στο εύρος θερμοκρασιών 30-50 °C είναι ότι οι κορυφές μετατοπίζονται σε χαμηλότερο μαγνητικό πεδίο.

Είναι εμφανές ότι η φασματοσκοπία NMR με χρήση φασματογράφου 400 MHz δεν είναι πρόσφορη στον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση του δείγματος της HP-β-CD η οποία αποτελείται από ισομερή με διαφορετικό DS.

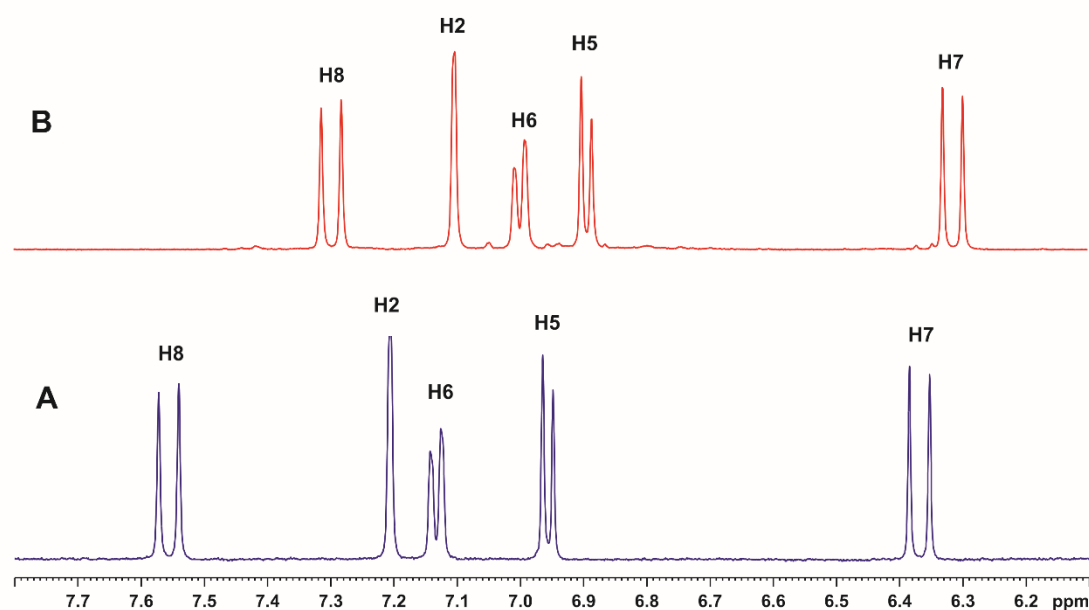


Σχήμα 37 Φάσμα ^1H NMR της HP-β-CD σε D_2O στις θερμοκρασίες (A) 30 °C (B) 35 °C (Γ) 40 °C (Δ) 45 °C και (E) 50 °C.

Φάσμα ^1H -NMR του CA:

Η χρήση υψηλού πεδίου στο NMR όπως έχει ήδη αναφερθεί παράγει φάσματα υψηλής διαχωριστικότητας τα οποία παρουσιάζουν πληθώρα κορυφών που χρειάζονται ταυτοποίηση. Στα συμπλοκά, τα φάσματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εύρεση υδρόφοβης ή υδρόφιλης σύμπλεξης καθώς και να δώσουν δομικές λεπτομέρειες υπολογίζοντας τις μεταβολές των χημικών μετατοπίσεων [222, 223].

Σε αντιστοιχία με τις μεταβολές των χημικών μετατοπίσεων ^{13}C , στο φάσμα ^1H -NMR (Σχήμα 38) οι χημικές μετατοπίσεις κατευθύνονται σε περισσότερο προασπισμένες περιοχές λόγω συμπλοκοποίησης. Συγκεκριμένα, τα H6 και H8 παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες μεταβολές χημικής μετατόπισης υποδεικνύοντας διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ CA και HP-β-CD (Πίνακας 8).



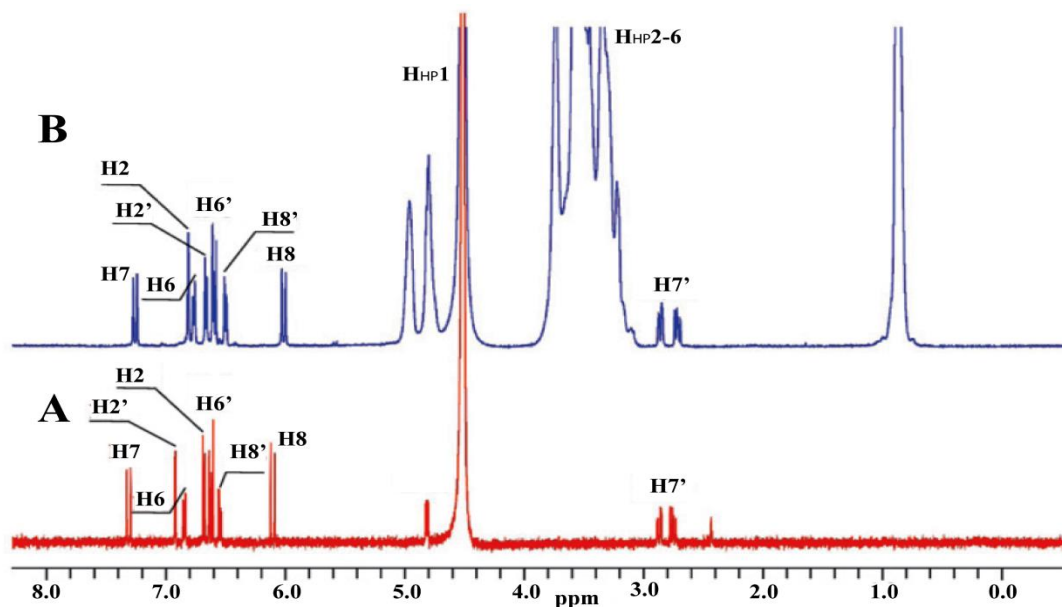
Σχήμα 38 Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ σε υγρή κατάσταση του καφεϊκού οξέος (A) και του συμπλόκου του με HP- β -CD (B) [41].

Πίνακας 8 $^1\text{H-NMR}$ χημικές μετατοπίσεις του CA όπως αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Σύγκριση με το συμπλοκοποιημένο με HP- β -CD.

| Άτομα H του CA | $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CD_3OD , 243K) [176] | $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6) [216] | $^1\text{H-NMR}$ CA συμπλοκοποιημένο με HP- β -CD (600MHz, DMSO-d_6 , 310K) | $\Delta\delta$ ppm |
|----------------|--|---|--|--------------------|
| 2 | 7,02 | 7,08 | 6,99 | -0,05 |
| 5 | 6,76 | 6,81 | 6,75 | -0,03 |
| 6 | 6,92 | 7,02 | 6,89 | -0,07 |
| 8 | 7,51 | 7,47 | 7,32 | -0,16 |
| 7 | 6,20 | 6,22 | 6,17 | -0,03 |

Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του RA:

Πληροφορίες για τον προσανατολισμό του συμπλόκου με το RA, όπως με το CA, μπορεί να ληφθούν μέσω του $\Delta\delta$ ppm των κορυφών $^1\text{H-NMR}$ (Σχήμα 39)(Πίνακας 9) του ελεύθερου RA και της ενθυλακωμένης μορφής. Σημαντικές διαφορές παρατηρούνται στα H6 και H7 του RA.



Σχήμα 39 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του RA υγρής κατάστασης (A) και του συμπλόκου του με HP- β -CD (B). Η κορυφή υψηλής έντασης στα περίπου 1 ppm αντιστοιχεί στις μεθυλομάδες των υδροξυλο-προπυλικών ομάδων. Οι χημικές μετατοπίσεις του HP- β -CD είναι σύμφωνες με εκείνες που αναφέρονται σε προηγούμενες μελέτες [224].

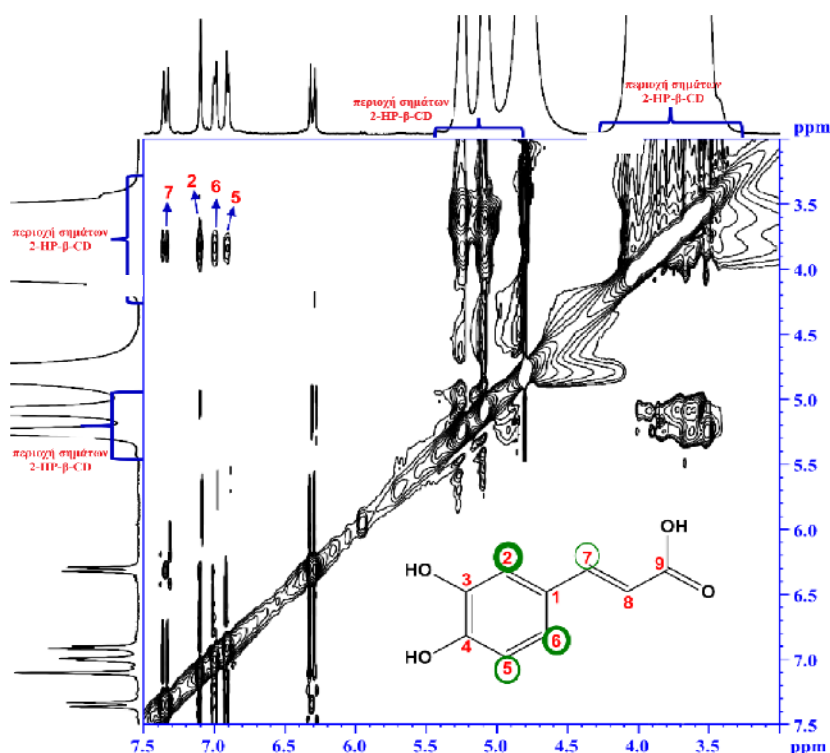
Πίνακας 9 ^1H χημικές μετατοπίσεις του RA στη βιβλιογραφία. Σύγκριση με το συμπλοκοποιημένο με HP- β -CD.

| Άτομα H του RA | $^1\text{H-NMR}$ RA (500MHz DMSO- d_6 ,313K) [220] | $^1\text{H-NMR}$ RA (500MHz DMSO- d_6) [221] | $^1\text{H-NMR}$ συμπλοκοποιημένο με HP- β -CD (600MHz, DMSO- d_6 ,310K) | $\Delta\delta$ ppm |
|----------------|--|---|--|--------------------|
| 2 | 7,07 | 7,06 | 7,04 | 0,02 |
| 5 | 6,78 | 6,77 | 6,77 | 0,01 |
| 6 | 7,02 | 7,01 | 6,97 | 0,04 |
| 7 | 7,48 | 7,47 | 7,40 | 0,07 |
| 8 | 6,26 | 6,24 | 6,19 | 0,06 |
| 2' | 6,70 | 6,69 | 6,67 | 0,02 |
| 6' | 6,65 | 6,64 | 6,62 | 0,03 |
| 7' | 6,54 | 6,53 | 6,51 | 0,02 |
| 8' | 3,01/2,92 | 3,70 | 3,01 | 0,05 |
| 9' | | 5,03 | 5,03 | 0.0 |

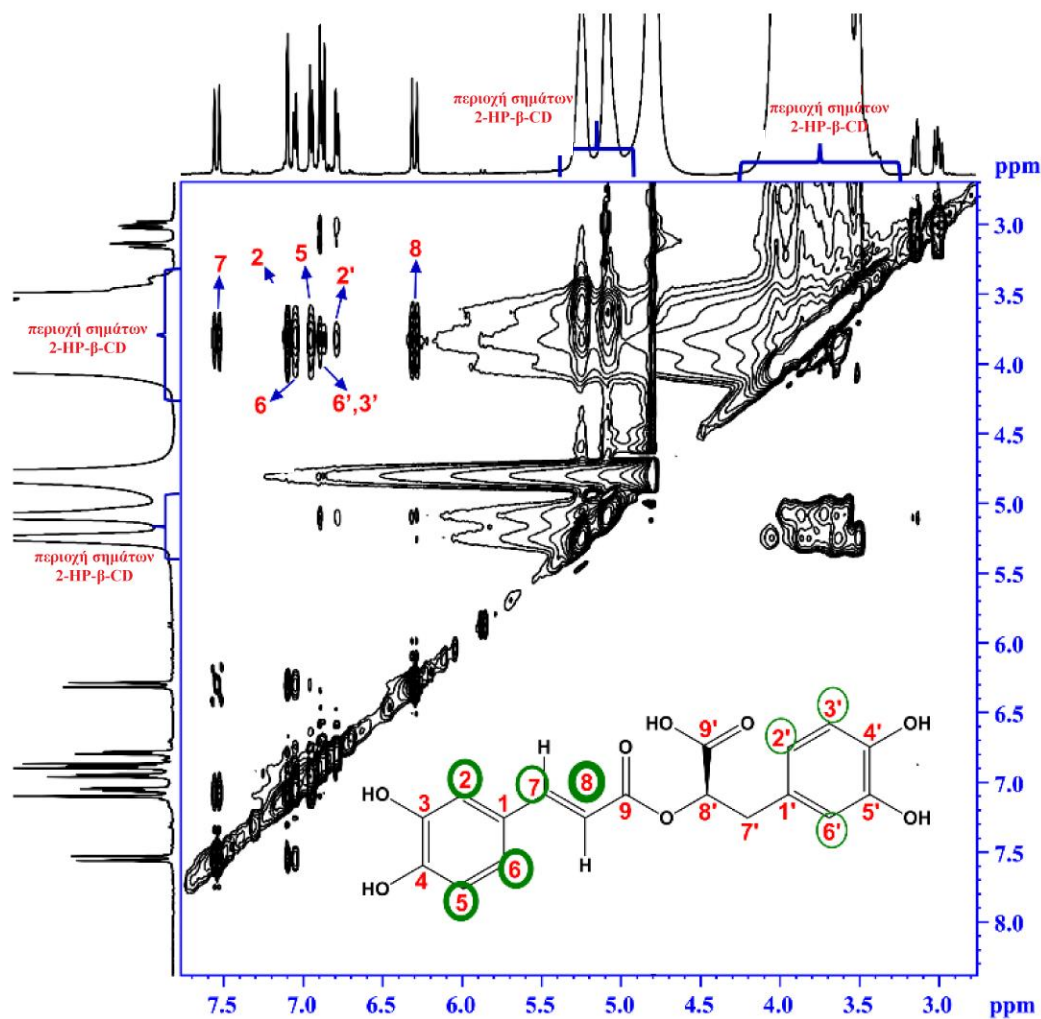
Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τόσο στο ροσμαρινικό όσο και στο καφεϊκό οξύ παρουσιάζονται μεγάλες διακυμάνσεις στα H6 και H8.

Φάσματα 2D NOESY των CA και RA:

Τα φάσματα ^1H - ^1H 2D NOESY NMR των δύο συμπλόκων της HP- β -CD με CA και RA απεικονίζονται στο Σχήμα 40 και στο Σχήμα 41. Και στα δύο σύμπλοκα το κρίσιμο NOE είναι μεταξύ των αρωματικών H2, H5, H6 του δακτυλίου A και των H_{HP}2-6 της HP- β -CD. Έντονη κορυφή συσχέτισης παρατηρείται επίσης μεταξύ του H7 του CA και του H8 του ροσμαρινικού οξέος με τα H_{HP}2-6 της HP- β -CD. Τα H2', H3' και H6 'του B δακτυλίου στο RA, παρουσιάζουν επίσης NOE, αν και το σήμα είναι ασθενέστερο. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το CA και το RA εισέρχονται εντελώς στον υδρόφοβο πυρήνα της κοιλότητας HP- β -CD, κυρίως μέσω του αρωματικού δακτυλίου όπως περιγράφεται και στα Δδ των φασμάτων NMR.



Σχήμα 40 2D ^1H - ^1H NOESY NMR του συμπλόκου του CA-HP- β -CD σε D_2O χρησιμοποιώντας χρόνο μίξης (τ_m) 300 ms. Οι συσχετίσεις NOE του CA με την HP- β -CD υποδεικνύονται με περιφερειακούς πράσινους δακτυλίους επί των αριθμών. Η ένταση του πράσινου χρώματος δείχνει την ένταση του σήματος. Οι συσχετισμοί στα σχετικά φάσματα κάτω από τη διαγώνιο λείπουν λόγω της επικάλυψης με τη χημική δομή της ένωσης.



Σχήμα 41 2D ^1H - ^1H NOESY NMR του συμπλόκου του RA-HP- β -CD χρησιμοποιώντας χρόνο μίξης 300 ms. Τα NOE που αναπτύσσονται μεταξύ του RA και της HP- β -CD υποδεικνύονται με περιφερειακούς πράσινους δακτυλίους επί των αριθμών. Η ένταση του πράσινου χρώματος δείχνει την ένταση του σήματος. Οι συσχετισμοί στα σχετικά φάσματα κάτω από τη διαγώνιο λείπουν λόγω της επικάλυψης με τη χημική δομή της ένωσης.

4.3.4 ITC και εξαγωγή θερμοδυναμικών παραμέτρων

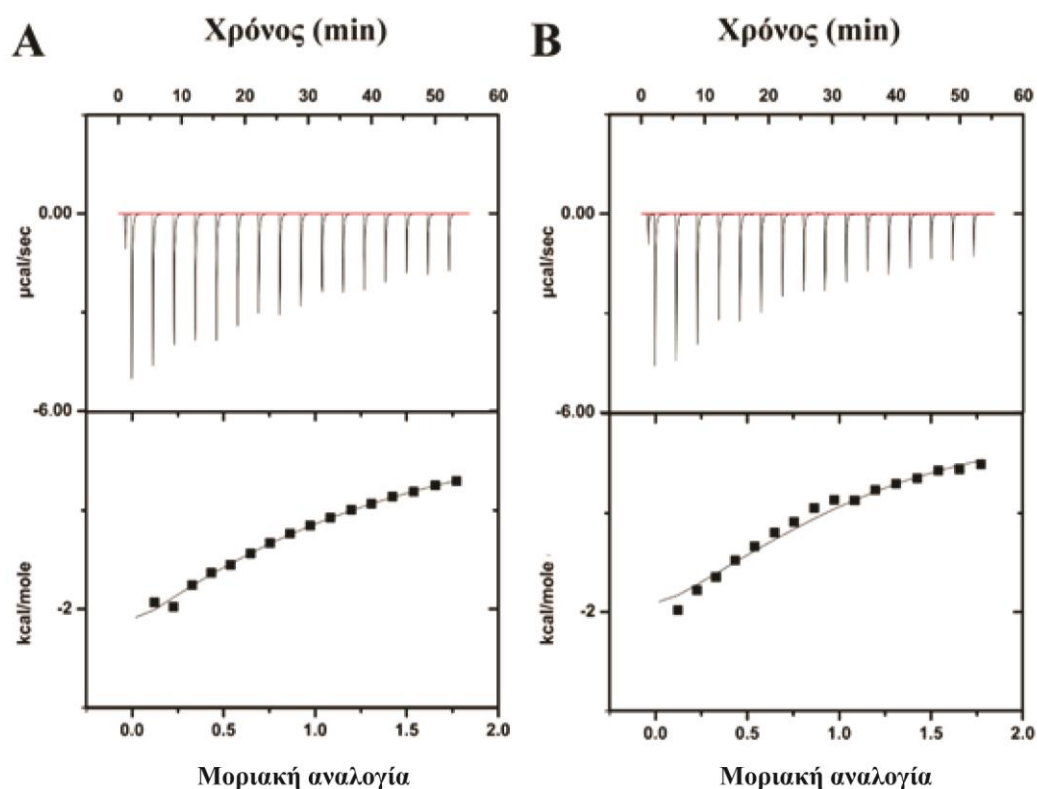
Για την αξιολόγηση των θερμοδυναμικών παραμέτρων των δύο συμπλοκών χρησιμοποιήθηκε θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC). Οι θερμοδυναμικές μετρήσεις δείχνουν ότι και τα δύο σύμπλοκα παρουσιάζουν παρόμοιο τρόπο ενθυλάκωσης που είναι σύμφωνος με τις τιμές των ανάλογων αλληλεπιδράσεων μεταξύ κυκλοδεξτρινών και φυτοχημικών ενώσεων που παρουσιάζονται στη βιβλιογραφία [225]. Εν τούτοις, η σύμπλεξη RA-HP- β -CD

παρουσιάζει 2 φορές υψηλότερη συγγένεια ($K_d = 0,5 \text{ mM}$) σε σύγκριση με αυτή του CA-HP-β-CD ($K_d = 1,3 \text{ mM}$) (Σχήμα 42, Πίνακας 11). Η συμπλοκοποίηση είναι και στις δυο περιπτώσεις εξώθερμη, αφού η μεταβολή στην ενθαλπία είναι αρνητική και επιτυγχάνεται αυθόρμητα με διαλύτη το νερό ($\Delta G < 0$). Μέσω της ανάλυσης των ενθαλπικών και εντροπικών όρων και στις δύο αλληλεπιδράσεις, γίνεται εμφανές ότι στο καφεϊκό οξύ, μια πιο πολική ένωση με $\log P$ 1,15 (σύμφωνα με τη χημική βάση δεδομένων Pubmed), η συμπλοκοποίηση οδηγείται ενθαλπικά. Επιπροσθέτως, ο σχηματισμός του συμπλόκου σχετίζεται κυρίως με δεσμούς υδρογόνου και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Αντίθετα, στην περίπτωση του RA, η αλληλεπίδραση ευνοείται ενθαλπικά και εντροπικά ($\Delta S > 0$), η τελευταία οφείλεται στον λιγότερο πολικό χαρακτήρα του μορίου, ο οποίος εμφανίζει $\log P$ ίσο με 1,82 (σύμφωνα με τη χημική βάση δεδομένων Pubmed). Συγκεκριμένα, ο θετικός εντροπικός όρος αυξάνεται λόγω της διάσπασης του κελύφους ενυδάτωσης και της διάθεσης των μορίων ύδατος στον ευρύτερο χώρο (bulk) [226]. Αυτό επιβεβαιώνει επίσης τη λιγότερη ενθαλπική συμβολή στην περίπτωση του RA ($\Delta H = -2963 \pm 179,4 \text{ cal/mol}$) σε σχέση με το καφεϊκό οξύ ($\Delta H = -4855 \pm 164 \text{ cal/mol}$). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι σταθερές δέσμευσης για τις συμπλοκοποιήσεις RA-HP-β-CD και CA-HP-β-CD που αναφέρονται στη βιβλιογραφία δείχνουν χαμηλότερες τιμές [193, 227]. Ωστόσο, αυτές οι τιμές υπολογίστηκαν μέσω φασματοσκοπικών τεχνικών φθορισμού οι οποίες είναι λιγότερο ευαίσθητες σε σχέση με την ITC (Πίνακας 10).

Πίνακας 10 Σύγκριση υπολογιζόμενων σταθερών δέσμευσης των CA/RA-HP-β-CD συμπλόκων μέσω ITC με τις αντίστοιχες της βιβλιογραφίας.

| Πηγή | Μέθοδος | Σταθερά δέσμευσης K (M^{-1}) |
|---|-------------------------------------|----------------------------------|
| Zhang, Li, Zhang and Chao [193] | Φθορισμομετρία συμπλόκου CA-β-HP-CD | 279±11 |
| Çelik, Özyürek, Tufan, Güçlü and Apak [227] | Φθορισμομετρία συμπλόκου RA-β-HP- | 267±54 |

| | CD | |
|-----------------|--------------------------|----------|
| Παρούσα εργασία | ITC συμπλόκου CA-HP-β-CD | 760±52 |
| Παρούσα εργασία | ITC συμπλόκου RA-HP-β-CD | 1800±314 |



Σχήμα 42 ITC διαγράμματα αλληλεπίδρασης HP-β-CD (10 mM) με (A) CA και (B) RA.

Πίνακας 11 Θερμοδυναμικές παράμετροι της αλληλεπίδρασης HP-β-CD με καφεϊκό και ροσμαρινικό οξύ.

| HP-β-CD | K (M ⁻¹) | K _d (mM) | ΔH (cal/mol) | ΔS (cal/mol/deg) | TΔS (cal/mol) | ΔG (cal/mol) |
|-----------------|----------------------|---------------------|---------------|------------------|---------------|--------------|
| Καφεϊκό οξύ | 760 ± 52.1 | 1.3 | -4855 ± 164 | -3.1 | 923.8 | -3931 |
| Ροσμαρινικό οξύ | 1800 ± 314 | 0.55 | -2963 ± 179.4 | 4.96 | 1478.0 | -4441.0 |

4.3.5 Πειράματα μοριακής δυναμικής

Οι προσομοιώσεις MD έδειξαν ένα σταθερό σύστημα 1:1 και στα δύο φυσικά προϊόντα, σε συμφωνία με τα φάσματα MS. Το καφεϊκό οξύ ενθουλακώθηκε πλήρως εντός της κοιλότητας HP-β-CD έχοντας έτσι πιο αρνητικές τιμές ενθαλπίας από το ροσμαρινικό οξύ. Η HP-β-CD δομήθηκε λαμβάνοντας υπόψη τους βαθμούς υποκατάστασης (DS) [121]. Δημιουργήθηκαν δύο αρχικές δομές. Η πρώτη HP-β-CD δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας τέσσερις ομάδες υδροξυλίου (χαμηλό DS) και η δεύτερη παρομοίως με 10 υδροξυ-προπυλο ομάδες (υψηλό DS). Σύμφωνα με την βιβλιογραφία οι HP-β-CD με περισσότερες από τρεις βαθμούς υποκατάστασης εμφανίζουν σχεδόν άπειρη διαλυτότητα (ακόμα και σε συγκεντρώσεις 70%) έναντι αυτών που περιέχουν λιγότερους από 2,5 βαθμούς υποκατάστασης οι οποίες εμφανίζουν διαλυτότητα μικρότερη από τη β-CD. Οι αποδεκτές τιμές DS της HP-β-CD στην ευρωπαϊκή και αμερικάνικη φαρμακοποιία είναι μεταξύ 2.8 και 10.5 [121].

Πίνακας 12 Υπολογισμένες μεταβολές της ενθαλπίας του συστήματος CA (RA)-HP-β-CD που λαμβάνεται από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής ενός μικροδευτερολέπτου.

| Προσομοίωση | Υπολογισμένες μεταβολές της ενθαλπίας (kcal/mol)(Χαμηλού DS/Υψηλού DS) |
|----------------------------|--|
| Νερό | -14312,9/-14312,9 |
| CA(RA) | -14397,0/-14397,0(-14381,1/-14381,1) |
| HP-β-CD | -14067,3/-14254,3 |
| CA(RA)/HP-β-CD | -14160,5/-14351,6 (-14141,4/-14332,5) |
| | Ενθαλπία Πρόσδεσης (kcal/mol)(Χαμηλού DS/Υψηλού DS) |
| ΔH CA/[RA] (S.E.M) | -9,1(±0,2)/-13.7(±0,2) [-4,3(±0,2)/-8,8(±0,2)] |

Αναμενόμενο σφάλμα του μέσου όρου (SEM): $SEM = \text{Τυπική απόκλιση} / \sqrt{N}$. N είναι ο αριθμός των στιγμιότυπων τροχιάς που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων

Στον πίνακα 12 παρουσιάζονται οι υπολογιζόμενες εναthalπίες πρόσδεσης για τα σύμπλοκα χαμηλού/υψηλού DS. Οι αποκλίσεις από τις τιμές του ITC, στην περίπτωση του χαμηλού DS για το καφεϊκό και το ροσμαρινικό οξύ, βρίσκονται σε αποδεκτή κλίμακα (έως περίπου 4 kcal/mol διαφορά) όπως προβλέπεται στη βιβλιογραφία [228] και επιβεβαιώνουν, σε κάποιο βαθμό, την ικανότητα πρόβλεψης των τιμών ενθαλπίας ενός πειράματος ITC.

Στους Πίνακες 13 και 14 παρουσιάζεται η ανάλυση της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας δέσμησης για CA και RA αντίστοιχα, όπως λαμβάνονται από τους υπολογισμούς MM-PBSA.

Πίνακας 13 Ανάλυση της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας δέσμησης για το σύμπλεγμα CA-HP-β-CD όπως υπολογίστηκε με τη μέθοδο MM-PBSA.

| | Καφεϊκό οξύ Σύμπλοκο Χαμηλού DS | | Καφεϊκό οξύ Σύμπλοκο Υψηλού DS | |
|---|---------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|--------------------|
| | Μέση τιμή (kcal/mol) | ±SEM ¹ | Μέση τιμή (kcal/mol) | ±SEM ¹ |
| Ενέργεια | | | | |
| ΔE_{vdw} | -17,13 | 0,015 | -19,07 | 0,016 |
| $\Delta E_{ηλεκ}$ | -58,77 | 0,060 | -66,10 | 0,054 |
| ΔG_{PB} | 68,83 | 0,056 | 75,03 | 0,050 |
| $\Delta G_{κοιλότητας}$ | -1,99 | 0,000 | -3,56 | 0,000 |
| $\Delta E_{αέριο}$ | -75,90 | 0,062 | -85,17 | 0,055 |
| $\Delta G_{διαλ}$ | 66,84 | 0,056 | 71,47 | 0,050 |
| $\Delta H = \Delta E_{αέριο} + \Delta G_{διαλ}$ | -9,06 | 0,018 | -13,70 | 0,017 |
| $-T\Delta S_{συνολική}$ | 12,10 | 0,045 | 12,10 | 0,043 |
| $\Delta G_{πρόσδεσης}$ | 3,04 | 0,023 | -1,60 | 0,021 ² |

¹Αναμενόμενο σφάλμα του μέσου όρου (SEM): $SEM = \text{Τυπική απόκλιση} / \sqrt{N}$. N είναι ο αριθμός των στιγμιότυπων τροχιάς που χρησιμοποιήθηκαν κατά τους υπολογισμούς MM-PBSA (4000 στιγμιότυπα για την εντροπία και 40000 στιγμιότυπα για τα υπόλοιπα).

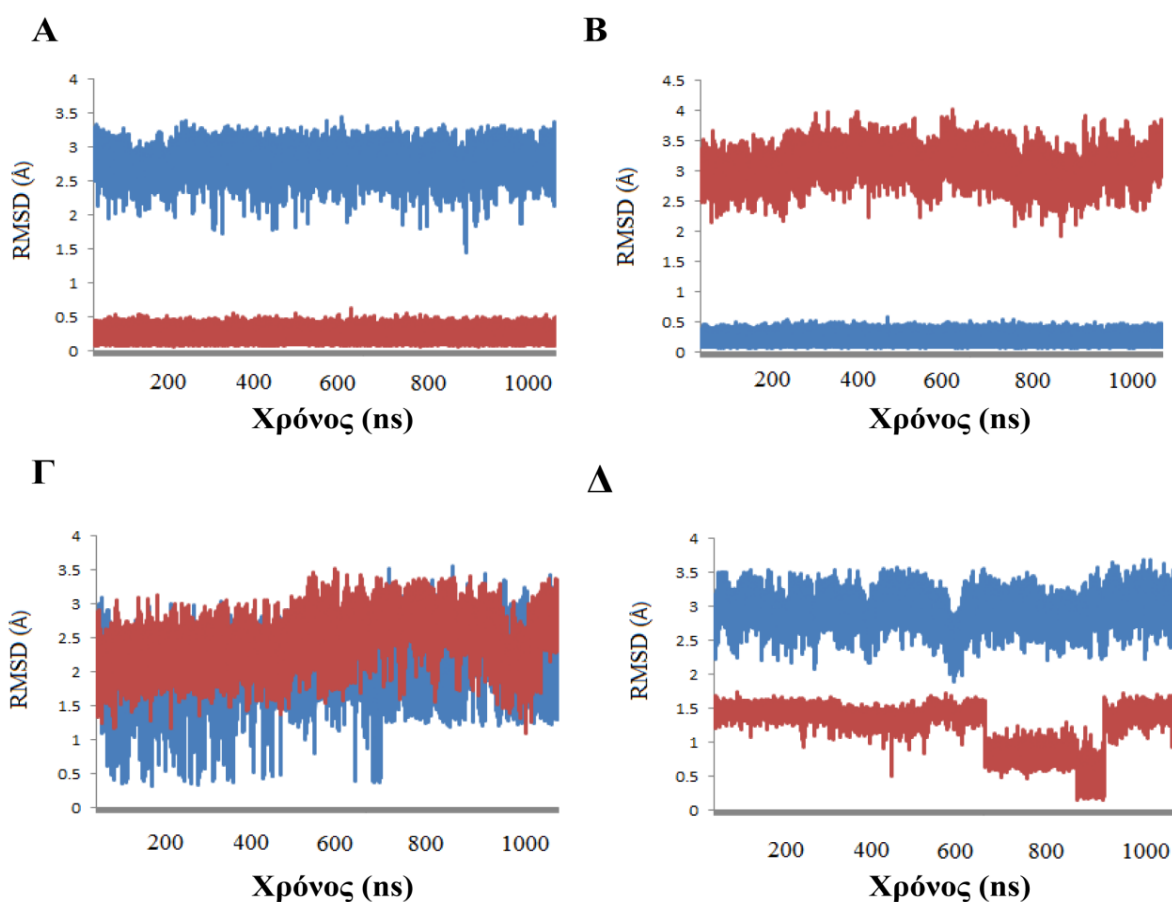
²Ένα τυπικό σφάλμα του μέσου όρου.

Πίνακας 14 Ανάλυση της μεταβολής της δέσμευσης ελεύθερης ενέργειας για το σύμπλοκο RA-HP-β-CD όπως υπολογίστηκε με τη μέθοδο MM-PBSA.

| Ενέργεια | Ροσμαρινικό οξύ Σύμπλοκο χαμηλού DS | | Ροσμαρινικό οξύ Σύμπλοκο υψηλού DS | |
|---|---|-------------------|--|--------------------|
| | Μέση τιμή (kcal/mol) | ±SEM ¹ | Μέση τιμή (kcal/mol) | ±SEM ¹ |
| ΔE_{vdw} | -34,66 | 0,019 | -37,67 | 0,023 |
| $\Delta E_{\eta\lambda\epsilon\kappa}$ | -55,35 | 0,044 | -58,40 | 0,064 |
| ΔG_{PB} | 89,47 | 0,072 | 90,82 | 0,045 |
| $\Delta G_{\kappa\omicron\iota\lambda\acute{o}\tau\eta\tau\alpha\varsigma}$ | -3,73 | 0,000 | -3,55 | 0,000 |
| $\Delta E_{\alpha\acute{\epsilon}\rho\iota\omicron}$ | -90,01 | 0,060 | -96,07 | 0,063 |
| $\Delta G_{\delta\iota\alpha\lambda}$ | 85,74 | 0,055 | 87,27 | 0,053 |
| $\Delta H = \Delta E_{\alpha\acute{\epsilon}\rho\iota\omicron} + \Delta G_{\delta\iota\alpha\lambda}$ | -4,27 | 0,017 | -8,80 | 0,020 |
| $-T\Delta S_{\sigma\upsilon\nu\omicron\lambda\iota\kappa\acute{\eta}}$ | 2,4 | 0,050 | 8,92 | 0,055 |
| $\Delta G_{\pi\rho\acute{o}\sigma\delta\epsilon\upsilon\sigma\eta\varsigma}$ | -1,87 | 0,022 | 0,12 | 0,020 ² |

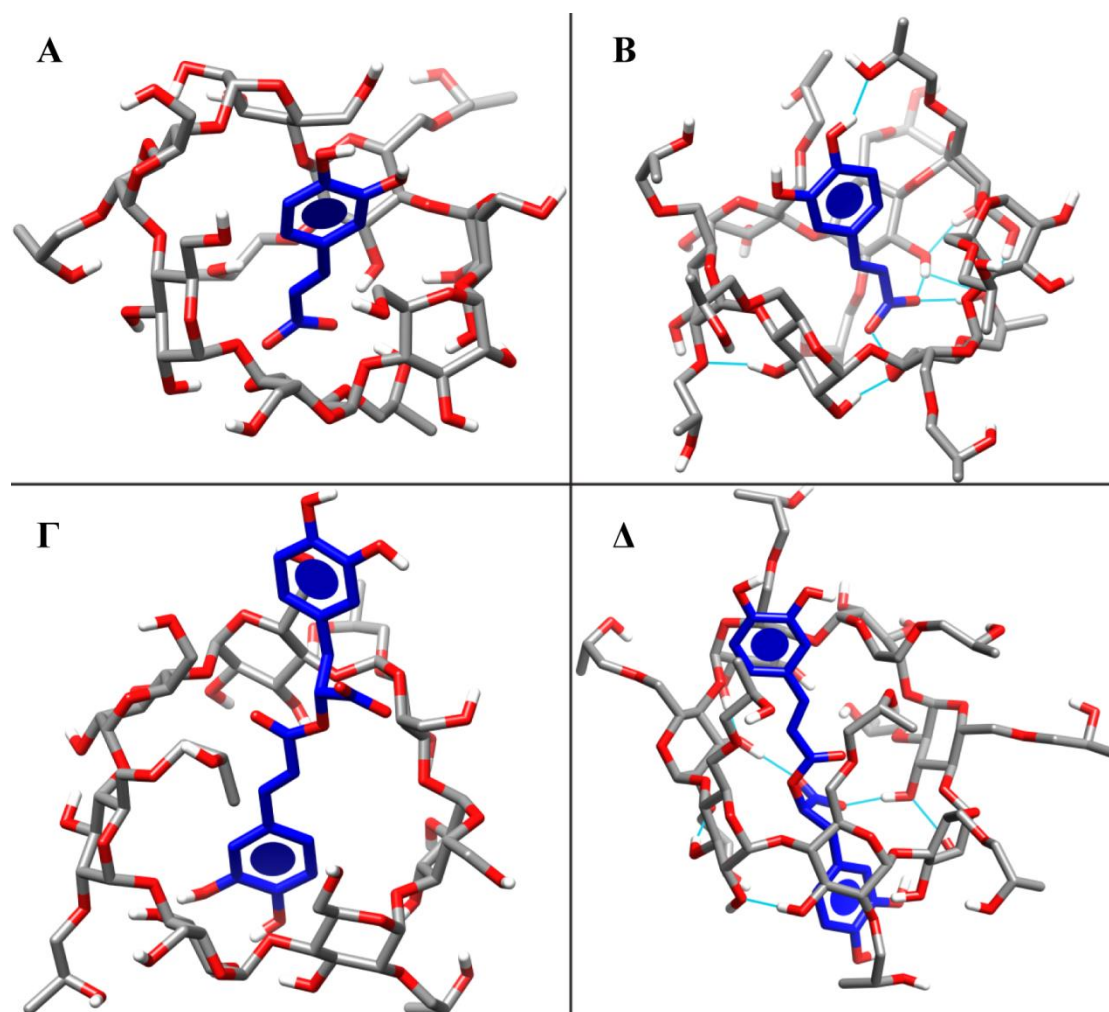
¹Αναμενόμενο σφάλμα του μέσου όρου (SEM): $SEM = \text{Τυπική απόκλιση} / \sqrt{N}$. N είναι ο αριθμός των στιγμιότυπων τροχιάς που χρησιμοποιήθηκαν κατά τους υπολογισμούς MM-PBSA (4000 στιγμιότυπα για την εντροπία και 40000 στιγμιότυπα για οτιδήποτε άλλο). ²Ένα τυπικό σφάλμα του μέσου όρου.

Η ανάλυση MM-PBSA των ενεργειών δέσμησης καταδεικνύει τη σημασία του DS στον σχηματισμό του συμπλόκου. Το CA προτιμά συμπλοκοποίηση με υψηλό DS ενώ το RA με χαμηλό DS, όπως προτείνεται από τις πιο αρνητικές ενέργειες δέσμησης. Η μείωση στην ενέργεια δέσμησης από CA σε RA (-1,60 και -1,87 αντίστοιχα) είναι σύμφωνη με τις πειραματικές τιμές ITC (-3,9 και -4,4 αντίστοιχα). Μπορεί να υποστηριχθεί ότι στο σύμπλοκο RA με χαμηλό DS, το RA καταλαμβάνει τον απαραίτητο όγκο για ν' ασκήσει σημαντικές αλληλεπιδράσεις με την τροποποιημένη κυκλοδεξτρίνη, ενώ παράλληλα διατηρεί τους βαθμούς ελευθερίας που δεν υπάρχουν σ' ένα σύμπλοκο υψηλού DS του RA. Τα διαγράμματα της ρίζας μέσης τετραγωνικής απόκλισης RMSD δείχνουν σταθερά συστήματα κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης καθώς δεν εμφανίζουν σημαντικές μεταβολές από την αρχική απόσταση (Σχήμα 43).



Σχήμα 43 Ρίζα της μέσης τετραγωνικής απόκλισης (RMSD) του γραφήματος HP-β-CD (κόκκινο), φυσικό προϊόν (μπλε). (A) Χαμηλό DS σύμπλοκο με CA, (B) Υψηλό DS σύμπλοκο με CA, (C) Χαμηλό DS σύμπλοκο με RA, (D) Υψηλό DS σύμπλοκο με RA.

Για όλα τα συστήματα δημιουργήθηκαν στιγμιότυπα (snapshots) σε κάθε 1 ps της προσομοίωσης μοριακής δυναμικής με συνολική διάρκεια 1μs. Τα αποτελέσματα δείχνουν ένα πλήρως ενθυλακωμένο καφεϊκό οξύ σε αντίθεση με τα ροσμαρινικό οξύ (Σχήμα 44). Το ροσμαρινικό οξύ εμφανίζεται να προτιμά μια γραμμική διαμόρφωση που κάμπτεται στις περισσότερες προσομοιώσεις σε αντίθεση με τη δομή που είχε προβλεφθεί προηγουμένως από τους *Medronho et al* [219].



Σχήμα 44 Στιγμιότυπο προσομοίωσης μοριακής δυναμικής, (Α) χαμηλού DS CA συμπλοκοποιημένου με 2-HP-β-CD, (Β) υψηλού DS CA συμπλοκοποιημένου με 2-HP-β-CD, (Γ) χαμηλού DS RA συμπλοκοποιημένου με 2-HP-β-CD, (Δ) υψηλού DS RA συμπλοκοποιημένου με 2-HP-β-CD.

Οι αρωματικοί δακτύλιοι των φυσικών ενώσεων παραμένουν εντός της υδρόφοβης κοιλότητας καθ' όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τις αναλύσεις των φασμάτων NMR που εμφανίζουν μεγαλύτερο $\Delta\delta$ στους αρωματικούς δακτυλίους. Σημαντική διαφορά υπάρχει και

στους δεσμούς υδρογόνου όπως φαίνεται στο Σχήμα 38, καθώς το σύμπλοκο του CA αναπτύσσει δεσμούς υδρογόνου στο υψηλά DS σύμπλοκο. Αντιθέτως, το RA συμπλοκοποιείται κυρίως λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.

4.3.6 Σύγκριση μοριακής δυναμικής με NOE

Η ανάλυση των υπολογισθεισών αποστάσεων μέσω της ακτινικής συνάρτησης κατανομής έδειξε σημαντικές ομοιότητες με τις πειραματικά υπολογισμένες αποστάσεις NOE. Χρησιμοποιώντας ως δεδομένο ότι το CA προτιμάει συμπλοκοποίηση με αρκετά υποκατεστημένες κυκλοδεξτρίνες ενώ το αντίθετο συμβαίνει στην περίπτωση του RA γίνεται άμεσα εμφανές η συμφωνία των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων.

Στον πίνακα 15 τα υδρογόνα H2 και H5-H8 του CA βρίσκονται εντός της κοιλότητας με διακριτές όμως προτιμήσεις ως προς την εγγύτητα τους με τα υδρογόνα της HP-β-CD. Για παράδειγμα τα H2 προτιμούν την εγγύτητα με τα υδρογόνα H3, H5 και H6, τα H5 του CA με τα H5 και H6 της κυκλοδεξτρίνης κτλ. Στον πίνακα 16 τ' αποτελέσματα συνάδουν με αυτά του σχήματος 40 επαληθεύοντας την προτίμηση του CA για σύμπλεξη με υψηλού DS κυκλοδεξτρίνες.

Πίνακας 15 Υπολογισθείσες αποστάσεις μέσω της ακτινικής συνάρτησης κατανομής μεταξύ της ολιγοϋποκατεστημένης HP-β-CD και του CA.

| CA συμπλεγμένο με HP-β-CD (DS=4) | | | | | |
|---|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | CD _{H2} | CD _{H3} | CD _{H4} | CD _{H5} | CD _{H6} |
| CA _{H2} | 5,75 | 3,05 | 5,55 | 2,25 | 2,85 |
| CA _{H5} | 7,45 | 7,15 | 6,75 | 4,55 | 3,95 |
| CA _{H6} | 5,95 | 3,15 | 5,35 | 2,55 | 4,25 |
| CA _{H7} | 5,55 | 2,25 | 4,85 | 3,95 | 4,35 |
| CA _{H8} | 5,75 | 2,45 | 5,05 | 4,35/4,45 | 6,15 |

Πίνακας 16 Υπολογισθείσες αποστάσεις μέσω της ακτινικής συνάρτησης κατανομής μεταξύ της υψηλά υποκατεστημένης HP-β-CD και του CA.

| CA συμπλεγμένο με HP-β-CD (DS=10) | | | | | |
|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | CD _{H2} | CD _{H3} | CD _{H4} | CD _{H5} | CD _{H6} |
| CA _{H2} | 4,95 | 3,65 | 5,25 | 2,25 | 4,03 |
| CA _{H5} | 4,55 | 6,35 | 6,15 | 3,65 | 3,35 |
| CA _{H6} | 2,45 | 2,95 | 5,35 | 2,35 | 2,85 |
| CA _{H7} | 5,55 | 2,55 | 5,05 | 3,75 | 4,45 |
| CA _{H8} | 4,65 | 2,35 | 4,85 | 3,75 | 3,75 |

Αντίστοιχα, στον πίνακα 17 δίνεται η πληροφορία ότι τα H2-8 του RA βρίσκονται σε χωρική εγγύτητα με τα H2-6 της HP-β-CD. Τα αποτελέσματα αυτά όπως και οι μεγάλες χωρικές αποστάσεις >5,5 Å, οι οποίες αποτελούν τα μη παρατηρήσιμα NOE των H2', H7' και H8' του RA βρίσκονται σε συμφωνία με τα δεδομένα που παρουσιάζονται στο σχήμα 41. Σε αντίθεση με τα προηγούμενα, το μοντέλο του RA-χαμηλής DS HP-β-CD του πίνακα 18 αποτυγχάνει να εξηγήσει τις αλληλεπιδράσεις που εμφανίζονται στο σχήμα 32 καθώς υπολογίζει εγγύτητα των H2', H7 και H8' του RA στα H2-H5 ενώ αποκλείει τα H2 και H5 που εμφανίζουν ισχυρά σήματα NOE (π.χ. RA_{H2}-CD_{H2}=10,45).

Πίνακας 17 Υπολογισθείσες αποστάσεις μέσω της ακτινικής συνάρτησης κατανομής μεταξύ της ολιγοϋποκατεστημένης HP-β-CD και του RA.

| RA συμπλεγμένο με HP-β-CD (DS=4) | | | | | |
|---|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | CD _{H2} | CD _{H3} | CD _{H4} | CD _{H5} | CD _{H6} |
| RA _{H2} | 5,35 | 2,45 | 4,95 | 2,45 | 4,15 |
| RA _{H5} | 6,45 | 2,45 | 5,55 | 5,35 | 6,35 |
| RA _{H6} | 5,35 | 2,35 | 5,05 | 2,45 | 4,25 |
| RA _{H7} | 6,25 | 4,05 | 5,25 | 2,35 | 3,15 |
| RA _{H8} | 5,75 | 5,15 | 4,65 | 2,25 | 4,15 |
| RA _{H8'} | 7,25 | 8,05 | 6,05 | 5,95 | 3,05 |
| RA _{H7'} | 9,25 | 9,05 | 8,55 | 6,45 | 4,75 |

| | | | | | |
|-------------------|------|------|------|------|------|
| RA _{H2'} | 9,55 | 7,55 | 8,65 | 6,05 | 4,05 |
| RA _{H5'} | 4,15 | 7,35 | 4,65 | 5,35 | 3,45 |
| RA _{H6'} | 7,75 | 8,05 | 8,75 | 5,25 | 3,85 |

Πίνακας 18 Υπολογισθείσες αποστάσεις μέσω της ακτινικής συνάρτησης κατανομής μεταξύ της υψηλά υποκατεστημένης HP-β-CD και του RA.

| RA συμπλεγμένο με HP-β-CD (DS=10) | | | | | |
|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | CD _{H2} | CD _{H3} | CD _{H4} | CD _{H5} | CD _{H6} |
| RA _{H2} | 10,45 | 6,25 | 5,55 | 3,25 | 3,15 |
| RA _{H5} | 7,55 | 6,15 | 6,55 | 3,95 | 4,95 |
| RA _{H6} | 6,15 | 3,75 | 4,95 | 2,25 | 4,15 |
| RA _{H7} | 6,95 | 4,45 | 7,05 | 2,35 | 3,35 |
| RA _{H8} | 5,15 | 2,35 | 4,75 | 2,55 | 5,65 |
| RA _{H8'} | 4,45 | 2,55 | 6,05 | 4,65 | 6,95 |
| RA _{H7'} | 5,15 | 2,15 | 4,95 | 3,35 | 6,25 |
| RA _{H2'} | 4,25 | 2,35 | 5,15 | 4,35 | 6,95 |
| RA _{H5'} | 5,55 | 4,25 | 6,85 | 6,65 | 8,95 |
| RA _{H6'} | 5,05 | 2,55 | 5,15 | 5,45 | 7,45 |

4.4 Συμπεράσματα

Το καφεϊκό και το ροσμαρινικό οξύ μπορούν να δράσουν αποτρεπτικά ή και θεραπευτικά σε διάφορες παθήσεις, ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζουν ελάχιστες παρενέργειες. Ένας κατάλληλος φορέας, όπως η HP-β-CD, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση των προβλημάτων βιοδιαθεσιμότητας που οφείλονται στην αυξημένη πολικότητα και μεγάλη ακορεστότητα των διπλών δεσμών τους. Χρησιμοποιώντας μια σειρά συμπληρωματικών τεχνικών αναζητήθηκαν τα χαρακτηριστικά δομικά στοιχεία των συμπλόκων. Ταυτόχρονα ο θεωρητικός υπολογισμός ενθαλπίας έδωσε παρόμοιες τιμές με αυτές της ITC. Πιο συγκεκριμένα, με τη χρησιμοποίηση της MS επαληθεύσαμε την 1:1 αναλογία σύμπλεξης μεταξύ CA ή RA με HP-β-CD, η οποία προβλέπεται επίσης από θεωρητικούς υπολογισμούς. Η τοπογραφική θέση και ο προσανατολισμός των CA ή RA συμπλοκοποιημένα με HP-β-CD μελετήθηκε χρησιμοποιώντας

φασματοσκοπία NMR στερεάς και υγρής κατάστασης. Οι δύο αυτές μέθοδοι έδωσαν τις αρχικές δομές που χρησιμοποιήθηκαν για τους υπολογισμούς MD. Οι αρχικές δομές αυτές παρείχαν σταθερά σύμπλοκα κατά τους υπολογισμούς MD ενώ επίσης αποκάλυψαν την πιο σταθερή δομή και τον βέλτιστο προσανατολισμό των CA και RA σε HP-β-CD. Οι θερμοδυναμικές παράμετροι υπολογίστηκαν με τις μεθόδους ITC και MD. Οι υπολογιζόμενες τιμές βρίσκονται παραπλήσιες, επαληθεύοντας τη σταθερή συμπλοκοποίηση καθώς επίσης είναι ισχυρή ένδειξη ότι το φαρμακινητικό προφίλ των CA και RA, θα μπορούσε να βελτιστοποιηθεί μέσω της μεταφοράς τους με την HP-β-CD και της αύξησης της διαλυτότητας ή βιοδιαθεσιμότητας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Σύμπλοκα της καντεσαρτάνης και της σιλεξετίλης της με HP-β-CD

5.1 Εισαγωγή

Τα προφάρμακα είναι ενώσεις που είναι αρχικά ανενεργές, αλλά μετατρέπονται σε δραστικές ουσίες μέσω μεταβολισμού στον οργανισμό. Είναι εξαιρετικά χρήσιμα στην αντιμετώπιση προβλημάτων όπως είναι η μικρή διαπερατότητα μέσω της κυτταρικής μεμβράνης, η αστάθεια σε όξινες ή βασικές συνθήκες στον οργανισμό, η τοξικότητα, ο μικρός χρόνος δραστηριότητας, ακόμη και η πικρή γεύση ενός φαρμάκου που επηρεάζει αρνητικά τη λήψη του από τους ασθενείς. Η μετατροπή του προφαρμάκου στην ενεργή μορφή του φαρμάκου συνήθως απαιτεί τη δράση κάποιου μεταβολικού ενζύμου, επομένως είναι πολύ σημαντικό να γνωρίζουμε τις συνήθεις βιοχημικές οδούς μεταβολισμού των φαρμάκων και των ενζύμων που συμμετέχουν σε αυτά ώστε ο μεταβολισμός στην αντίστοιχη ενεργή μορφή να είναι επιτυχής. Τα προφάρμακα μπορούν να αντιμετωπίσουν και άλλα προβλήματα πέραν των προαναφερθέντων, όπως είναι η μικρή ή η υπερβολική υδατοδιαλυτότητα, ο πόνος που προκαλεί το φάρμακο όταν ενίεται, η χημική και βιολογική σταθερότητα του, αλλά και η μεταφορά του σε συγκεκριμένη περιοχή του σώματος [229].

Το προφάρμακο της καντεσαρτάνης, η σιλεξετίλη της καντεσαρτάνης μεταβολίζεται γρήγορα στην γαστροεντερική οδό του σώματος αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα της. Ακόμα και με αυτόν τον τρόπο η απορρόφηση είναι αρκετά μικρή προσεγγίζοντας το 15% στις ταμπλέτες και 40% σε μορφή διαλύματος. Το IC_{50} της είναι 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [230].

5.2 Στόχος του κεφαλαίου

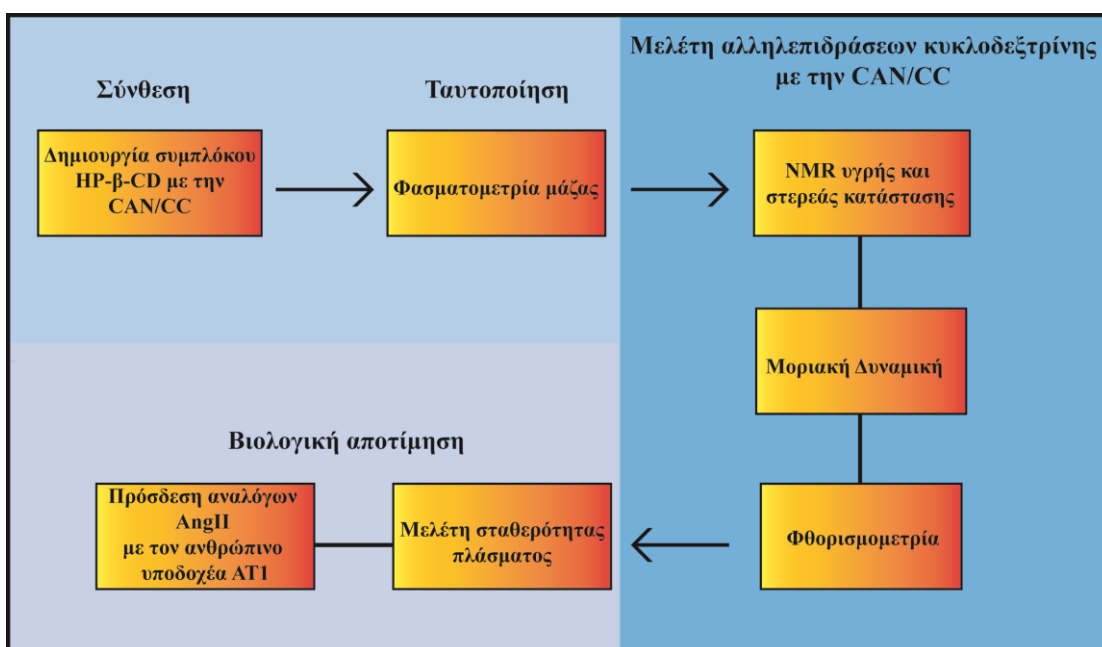
Στο παρόν κεφάλαιο έγινε αρχικά προσπάθεια να δημιουργηθούν σύμπλοκα HP-β-CD με το εμπορικά διαθέσιμο προφάρμακο της CAN, την CC, με σκοπό την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας της και άρα της δραστηριότητας της. Στη συνέχεια έγινε σύγκριση της ικανότητας πρόσδεσης της κυκλοδεξτρίνης με την CAN και τη CC χρησιμοποιώντας βιοφυσικές και υπολογιστικές μεθόδους. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε και στις δύο περιπτώσεις (Σχήμα 45)

αποκάλυψε την ισχυρότερη πρόσδεση της HP-β-CD με την CC και μειωμένη ανταγωνιστική ικανότητα του συμπλόκου, ενώ αντίστροφα ήταν τα αποτελέσματα στην περίπτωση της CAN [231].

Σκοπός του κεφαλαίου είναι:

- Να δώσει λεπτομέρειες για την δομή και τις θερμοδυναμικές παραμέτρους που διέπουν τα σύμπλοκα
- Να διερευνήσει τη δυνατότητα των CC-HP-β-CD ή CAN-HP-β-CD να διατεθούν ως εναλλακτικές φαρμακοτεχνικές μορφές.

Στο σχήμα 45 δεικνύεται η πορεία μελέτης των συντιθέμενων συμπλόκων CAN/HP-β-CD και CC/HP-β-CD.



Σχήμα 45 Διάγραμμα εργασιών για τη μελέτη των συμπλόκων CAN/CC με τη HP-β-CD. Η δημιουργία συμπλόκου μελετήθηκε στο κεφάλαιο 3 (Υλικά και μέθοδοι).

5.3 Πειραματικό μέρος

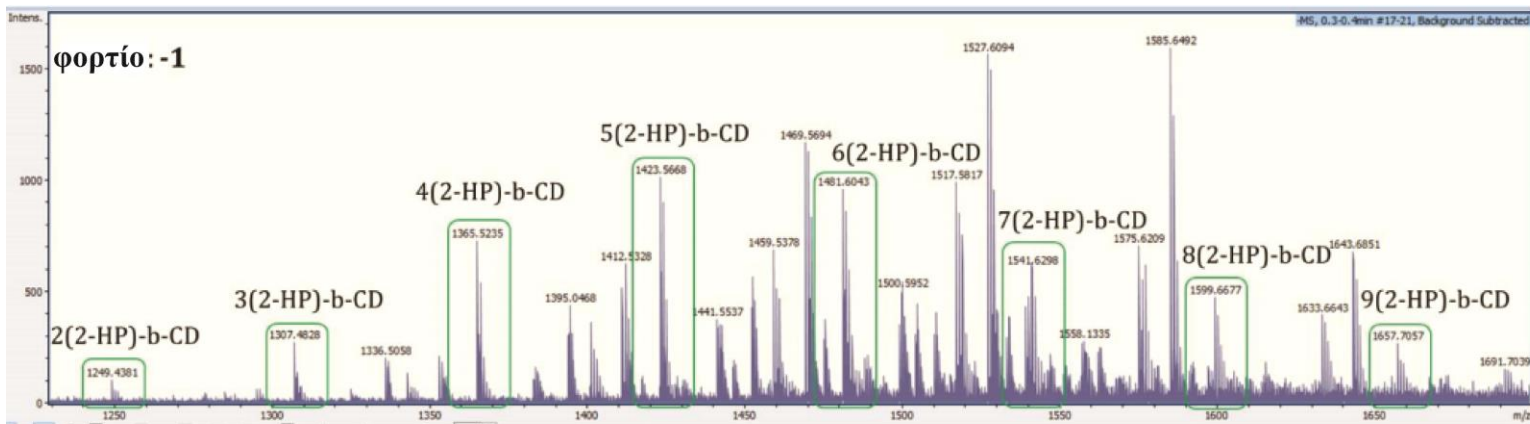
5.4 ESI-MS

Η τμηματική ανάλυση των θραυσμάτων εντός του συμπλόκου CAN-HP-β-CD, πραγματοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας ESI.

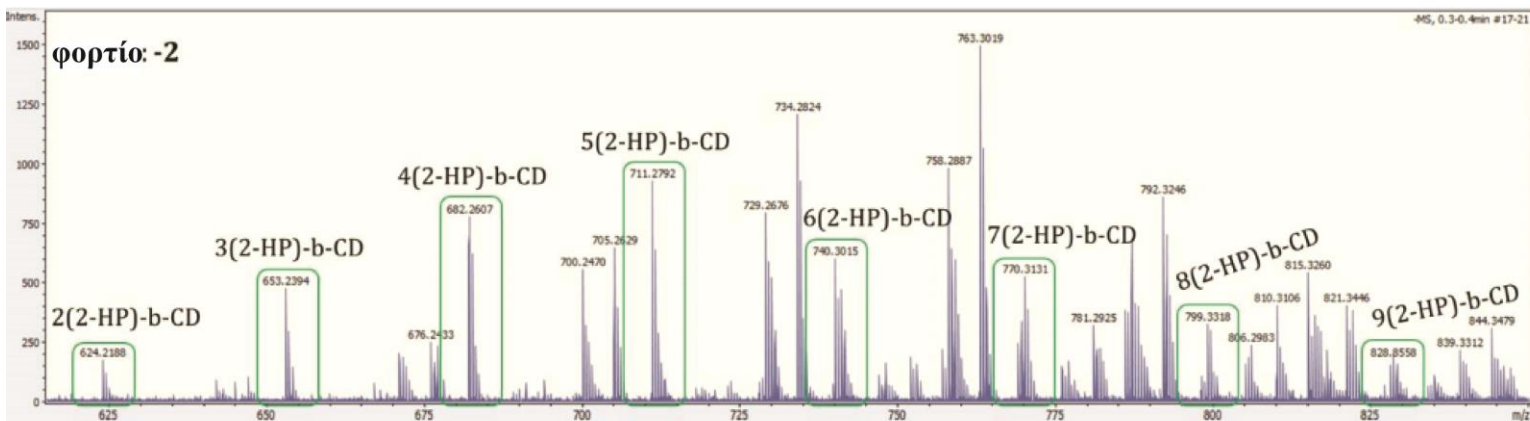
Στο Σχήμα 46, το φάσμα ESI-MS της HP-β-CD απεικονίζεται στην περιοχή αρνητικής σάρωσης μεταξύ m/z 1200 και 1700. Όπως αναμενόταν,

καταγράφηκε ευρεία κατανομή κορυφών, εντοπίζοντας τον διαφορετικό βαθμό της υποκατάστασης HP-β-CD. Στο σχήμα 46 παρουσιάζεται το φάσμα ESI-MS του συμπλόκου CAN-HP-β-CD. Παρατηρούνται πέντε κορυφές μεταξύ των τιμών m/z 1800 και 2000. Οι κορυφές αυτές στα 1846,4 , 1865,6 , 1923,3 , 1963,2 και 1982,1 m/z θα μπορούσαν να σχετίζονται άμεσα με πέντε τύπους συμπλεγμάτων εγκλεισμού με στοιχειομετρία 1:1. Οι αντίστοιχες κορυφές των ελεύθερων κυκλοδεξτρινών (χωρίς CAN) είναι εκείνες με m/z 1405,8 , 1424,7 , 1482,3 , 1522,0 και 1541,1.

α)



β)

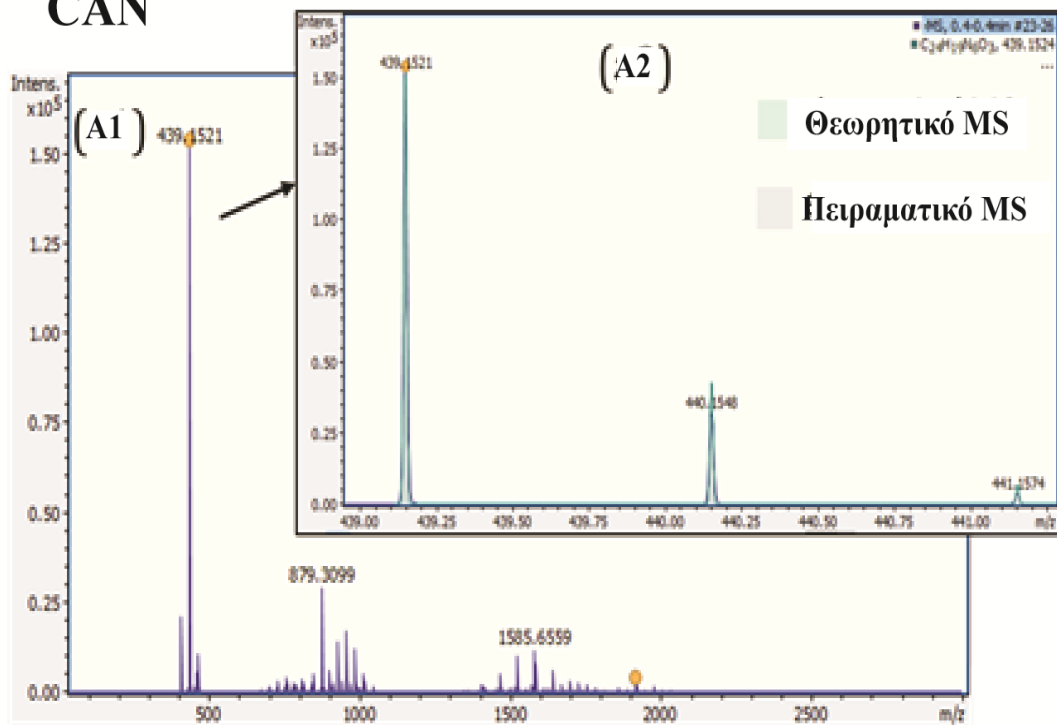


Σχήμα 46 Φάσμα μάζας του διαλύματος HP-β-CD, στην κλίμακα από 1200 έως 1700 Da, που περιλαμβάνει α) τα απλά φορτισμένα ιόντα κυκλοδεξτρινών υποκατεστημένα με 2 έως 9 ομάδες HP και (β) Φάσμα μάζας του ίδιου διαλύματος, στην κλίμακα από 600 έως 850 Da, που περιλαμβάνει τα διπλά φορτισμένα ιόντα κυκλοδεξτρινών υποκατεστημένα από 2 έως 9 ομάδες HP.

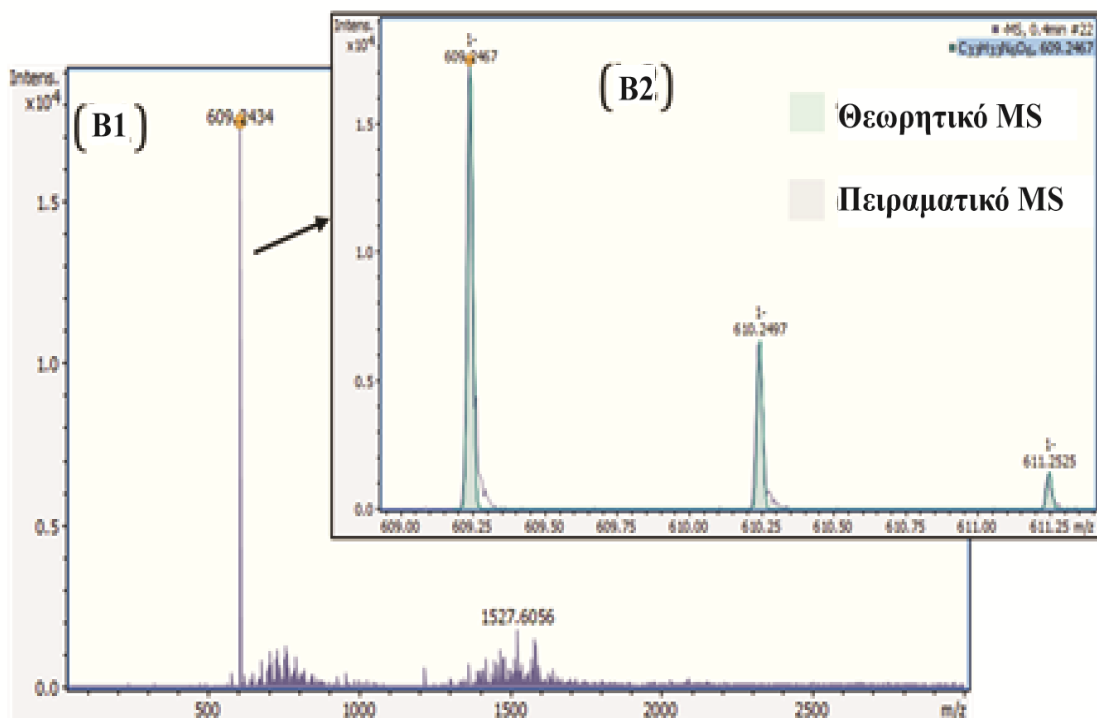
Η HP-β-CD όπως ήδη επεξηγήθηκε υπάρχει ως μίγμα κυκλοδεξτρινών με διαφορετικό βαθμό υποκατάστασης από την ομάδα HP. Συνεπώς, αναμένεται

ευρεία κατανομή κορυφών σε ESI-MS, η οποία είναι σύμφωνη με τα πειραματικά μας αποτελέσματα. Το σχήμα 46 (α) απεικονίζει το φάσμα μάζας του διαλύματος HP-β-CD στην κλίμακα από 1200 έως 1700 Da, που περιλαμβάνει τα ψευδομοριακά ιόντα των κυκλοδεξτρινών υποκατεστημένων από 2 έως 9 ομάδες HP. Επομένως, τα σύμπλοκα HP-β-CD με διαφορετικό βαθμό υποκατάστασης αναγνωρίστηκαν με βάση των μετρήσεων μάζας. Επιπλέον, αναμένεται ότι οι υποκατεστημένες κυκλοδεξτρίνες θα μπορούσαν επίσης να σχηματίσουν πολλαπλά φορτισμένα είδη, λόγω των χαρακτηριστικών δομής τους και του υψηλού MB. Η ευρεία κατανομή ιόντων που ανιχνεύθηκαν στην περιοχή μάζας 600 έως 850 Da επιβεβαίωσε την υπόθεση των διπλά φορτισμένων ιόντων Σχήμα 46 (β). Η ανάλυση του διαλύματος CAN-HP-β-CD οδήγησε σε ταυτόσημα αποτελέσματα, όσον αφορά την ταυτοποίηση συμπλόκων 2-HP-β-CD. Η αναγνώριση των μη συμπλοκοποιημένων φαρμάκων, CAN και CC, επιτεύχθηκε επίσης μέσω πληροφοριών υπολογισμού με ακρίβεια της μάζας και ισοτοπικού προφίλ. Τα σχήματα 47 (α1), (β1) απεικονίζουν τα φάσματα πλήρους σάρωσης MS των CAN και CC. Τα σχήματα 47 (α2), (β2) δείχνουν μια επικάλυψη του θεωρητικού και του πειραματικού φάσματος για CAN και CC αντίστοιχα. Είναι προφανές ότι υπάρχει ταύτιση μεταξύ του πειραματικού και του θεωρητικού φάσματος.

CAN



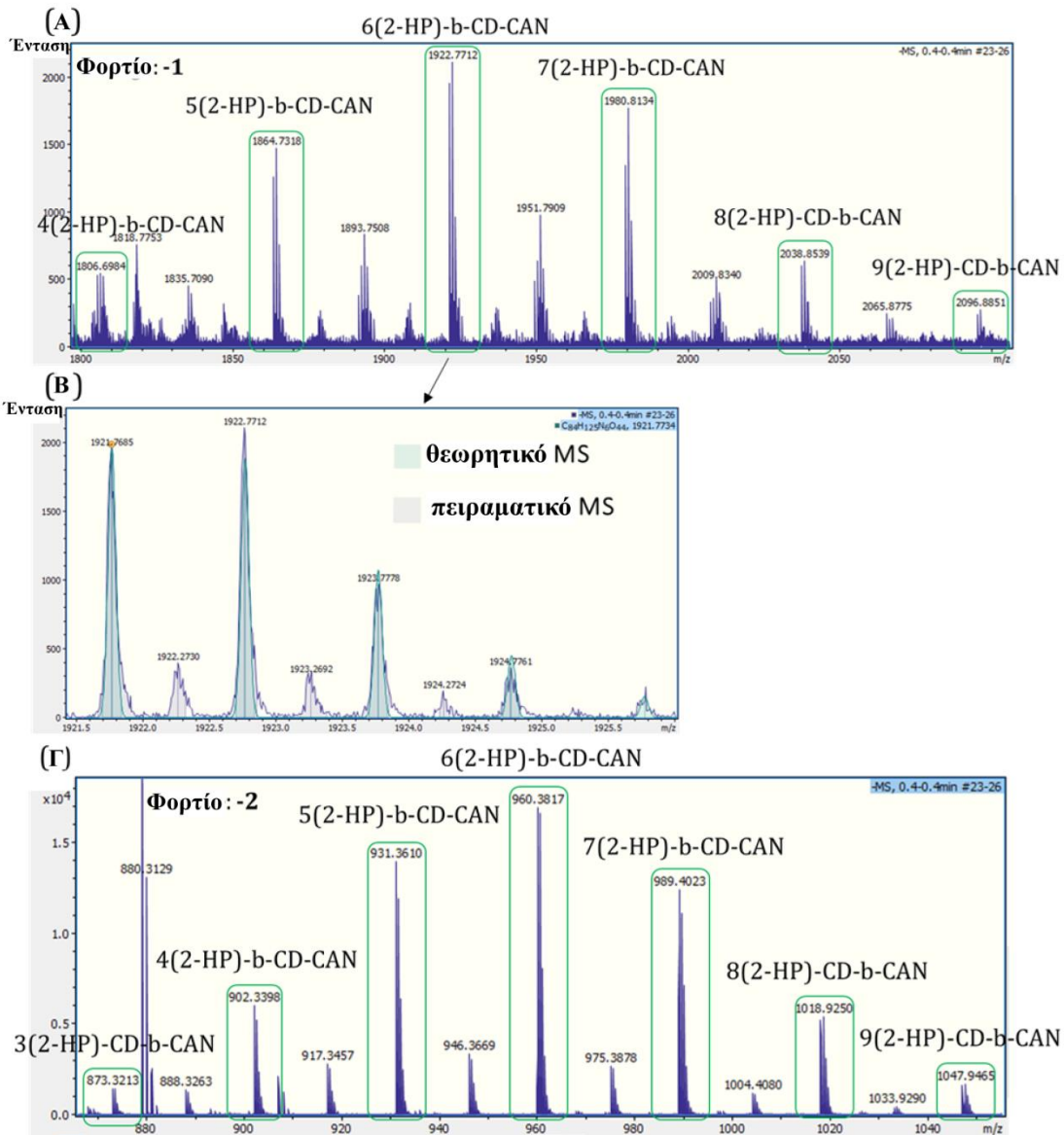
CC



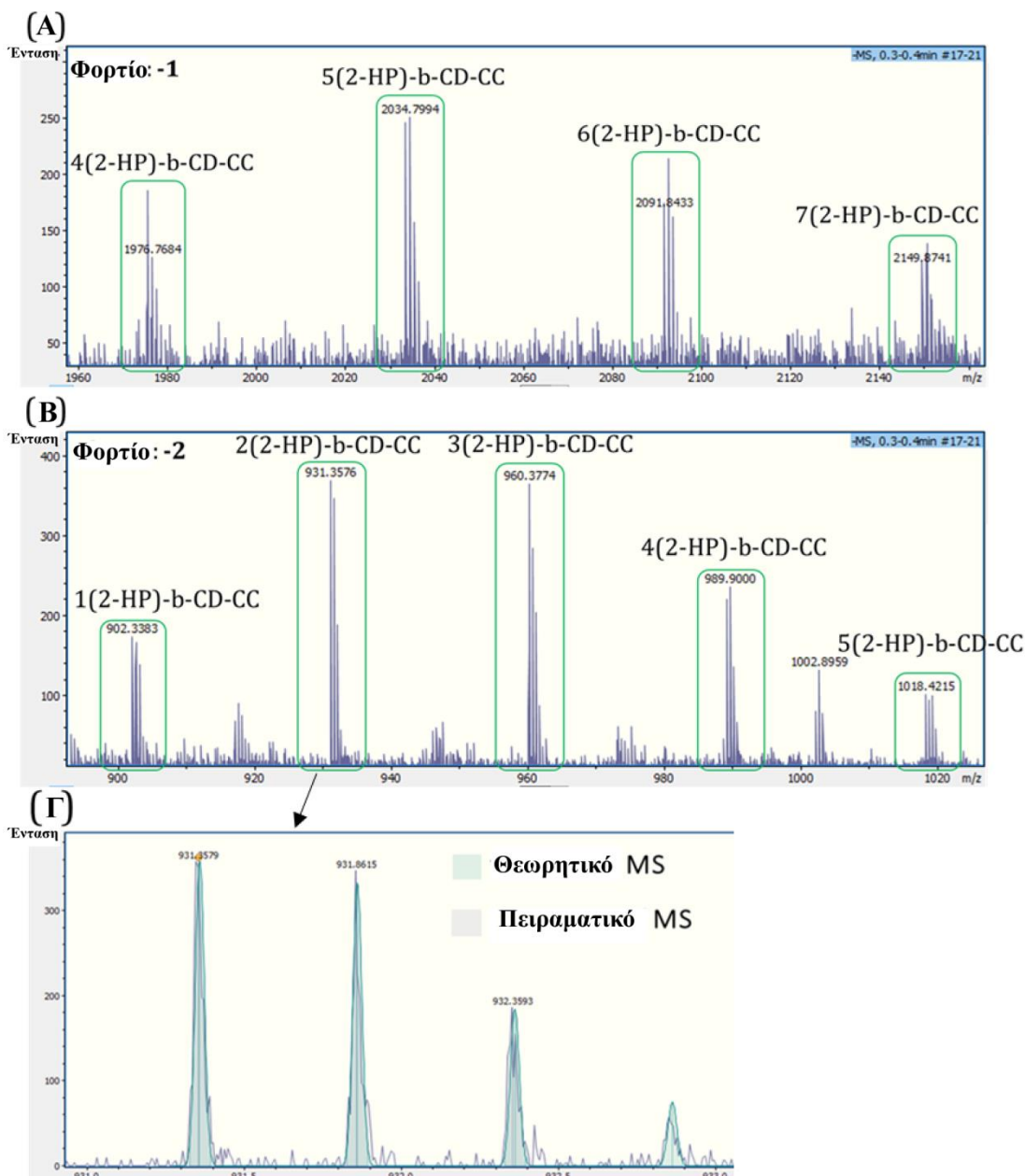
Σχήμα 47 (A1,B1) Πλήρης σάρωση MS των CAN και CC αντίστοιχα. (A2), (B2) Σύγκριση μεταξύ του θεωρητικού και πειραματικού φάσματος μάζας του ψευδομοριακού ιόντος CAN και CC αντίστοιχα.

Στο Σχήμα 48 (α) παρουσιάζεται το φάσμα MS πλήρους σάρωσης του CAN-HP-β-CD, στην περιοχή μάζας 1800-2100 Da. Τα ιόντα μέσα στα πράσινα ορθογώνια, αντιστοιχούν σε συμπλέγματα απλής φόρτισης CAN-HP-β-CD με διαφορετικό βαθμό υποκατάστασης β-CD από την ομάδα HP. Η ακρίβεια της μάζας καθώς και το ισοτοπικό προφίλ των προαναφερθέντων ιόντων είναι σύμφωνα με τις θεωρητικές των συμπλοκών CAN-HP-β-CD. Στο Σχήμα 48 (β) απεικονίζεται ένα παράδειγμα των αποτελεσμάτων ταυτοποίησης, μέσω της επικάλυψης των θεωρητικών και των πειραματικών φάσεων μάζας για ένα από τα σύμπλοκα (το 6-υποκατεστημένο). Είναι προφανές ότι τα φάσματα είναι σχεδόν πανομοιότυπα. Η πιθανή παρουσία πολλαπλών φορτισμένων ειδών διερευνήθηκε με βάση τα ευρήματά για τα σύμπλοκα πολλαπλών φορτίων της HP-β-CD. Η ευρεία κατανομή των ιόντων που ανιχνεύθηκαν στην περιοχή μάζας 860 έως 1060 Da επιβεβαίωσε την παρουσία διπλά φορτισμένων ιόντων CAN-HP-β-CD. Η ανίχνευση τόσο των μονών όσο και των διπλά φορτισμένων ειδών ενίσχυσε την ακρίβεια της αναγνώρισης.

Το πλήρες φάσμα MS σάρωσης του CC-HP-β-CD, στην περιοχή μάζας 1960-2160 Da, υπογραμμίζεται στο σχήμα 49 (α). Τα ιόντα μέσα στα πράσινα ορθογώνια, αντιστοιχούν στα σύμπλοκα CC-HP-β-CD με διαφορετικό φορτίο με διαφορετικό βαθμό υποκατάστασης της β-CD από την ομάδα HP. Η ακρίβεια της μάζας και το ισοτοπικό προφίλ των προαναφερθέντων ιόντων συμφωνούν με τα θεωρητικά των συμπλοκών CC-HP-β-CD. Η παρουσία δυνητικά πολλαπλών φορτίων ιόντων διερευνήθηκε, όπως στην περίπτωση του CAN-HP-β-CD. Η ανίχνευση ιόντων στην περιοχή μάζας 890 έως 1030 Da (Σχήμα 49) (β) επιβεβαίωσε την παρουσία διπλά φορτισμένων ιόντων CC-HP-β-CD. Στο σχήμα 49 (γ) απεικονίζεται ένα παράδειγμα των αποτελεσμάτων ταυτοποίησης μέσω της επικάλυψης των θεωρητικών και των πειραματικών φάσεων μάζας για ένα από τα συμπλέγματα διπλής φόρτισης (το 2-υποκατεστημένο). Είναι προφανές ότι τα παρουσιαζόμενα φάσματα βρίσκονται σε συμφωνία.



Σχήμα 48 (α) Πλήρες φάσμα MS σάρωσης του CAN-HP-β-CD στην περιοχή μαζών 1800-2100 Da. Τα ιόντα μέσα στα πράσινα ορθογώνια, αντιστοιχούν σε σύμπλοκα απλής φόρτισης CAN-HP-β-CD με διαφορετικό βαθμό υποκατάστασης β-CD από την ομάδα HP. (β) Επικάλυψη του θεωρητικού και του πειραματικού φάσματος μάζας ενός από τα σύμπλοκα (το 6-υποκατεστημένο) του CAN-HP-β-CD, ως παράδειγμα. (γ) Πλήρης σάρωση φάσματος MS του CAN-HP-β-CD στην περιοχή μάζας 860-1060 Da. Τα ιόντα μέσα στα πράσινα ορθογώνια, αντιστοιχούν σε διπλά φορτισμένα σύμπλοκα της CAN-HP-β-CD με διαφορετικό βαθμό υποκατάστασης της β-CD από ομάδα HP.

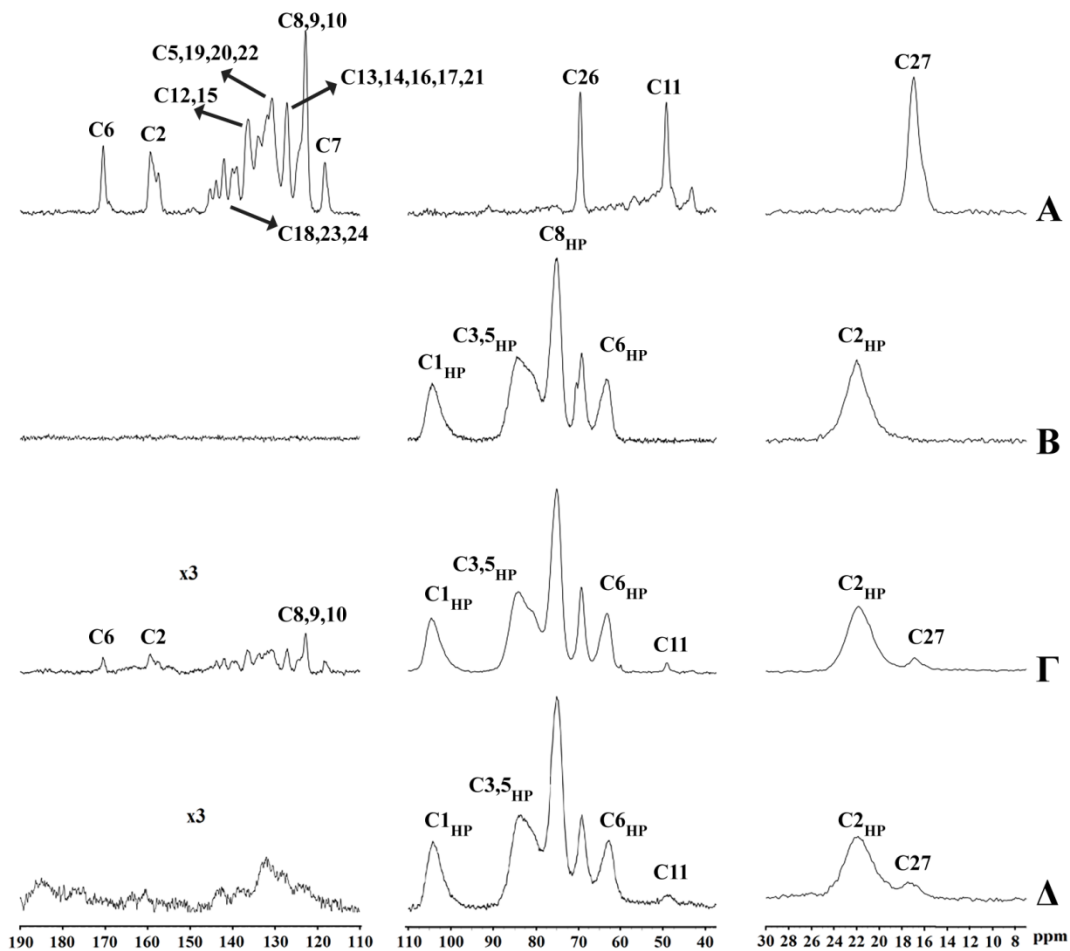


Σχήμα 49 (α) Πλήρης σάρωσης φάσμα MS του CC-HP-β-CD στην περιοχή μαζών 1960-2160 Da. Τα ιόντα μέσα στα πράσινα ορθογώνια, αντιστοιχούν σε συμπλέγματα CC-HP-β-CD με διαφορετικό φορτίο και με διαφορετικό βαθμό υποκατάστασης β-CD από την ομάδα HP. (β) Πλήρης σάρωση MS φάσμα CC-HP-β-CD στην περιοχή μάζας 890-1030 Da. Τα ιόντα μέσα στα πράσινα ορθογώνια, αντιστοιχούν σε συμπλέγματα διπλής φόρτισης CC-HP-β-CD με διαφορετικό βαθμό υποκατάστασης β-CD από την ομάδα HP. (γ) Επικάλυψη του θεωρητικού και του πειραματικού φάσματος μάζας ενός από τα σύμπλοκα (το 2-υποκατεστημένο) του CC-HP-β-CD, ως παράδειγμα.

5.5 ^{13}C CP/MAS αποτελέσματα

Οι αλληλεπιδράσεις του φαρμάκου στο σύμπλοκο του με HP- β -CD διερευνήθηκαν με τη βοήθεια φασματοσκοπίας ^{13}C CP/MAS ssNMR.

Αλληλεπιδράσεις CAN με HP- β -CD



Σχήμα 50 Στο σχήμα εμφανίζονται διάφορες περιοχές φάσματος (Α) ^{13}C CP/MAS CAN, (Β) HP- β -CD, (Γ) μίγμα CAN/HP- β -CD και (Δ) σύμπλοκο CAN/HP- β -CD (αναλογία 1:1).

Στην περιοχή 12-26 ppm, τα φάσματα του μίγματος (Σχήμα 50Γ) και του συμπλόκου (Σχήμα 50Δ) είναι σχεδόν πανομοιότυπα. Αυτό δείχνει ότι το C27 μεθύλιο (με κορυφή που συντονίζεται σε *ca* 18 ppm) του AT1 αντιϋπερτασικού μορίου δεν επηρεάζει διαφορετικά την HP- β -CD είτε είναι υπό μορφή μίγματος ή συμπλόκου. Σε αμφότερα το μίγμα και σύμπλοκο παρατηρείται διεύρυνση της

κορυφής C27, με το σύμπλοκο να παρουσιάζει πιο έντονη διεύρυνση. Το αποτελέσμα αυτό υποδηλώνει ότι υπάρχουν παρόμοιες αλληλεπιδράσεις στο μίγμα ή στο σύμπλοκο στον C27.

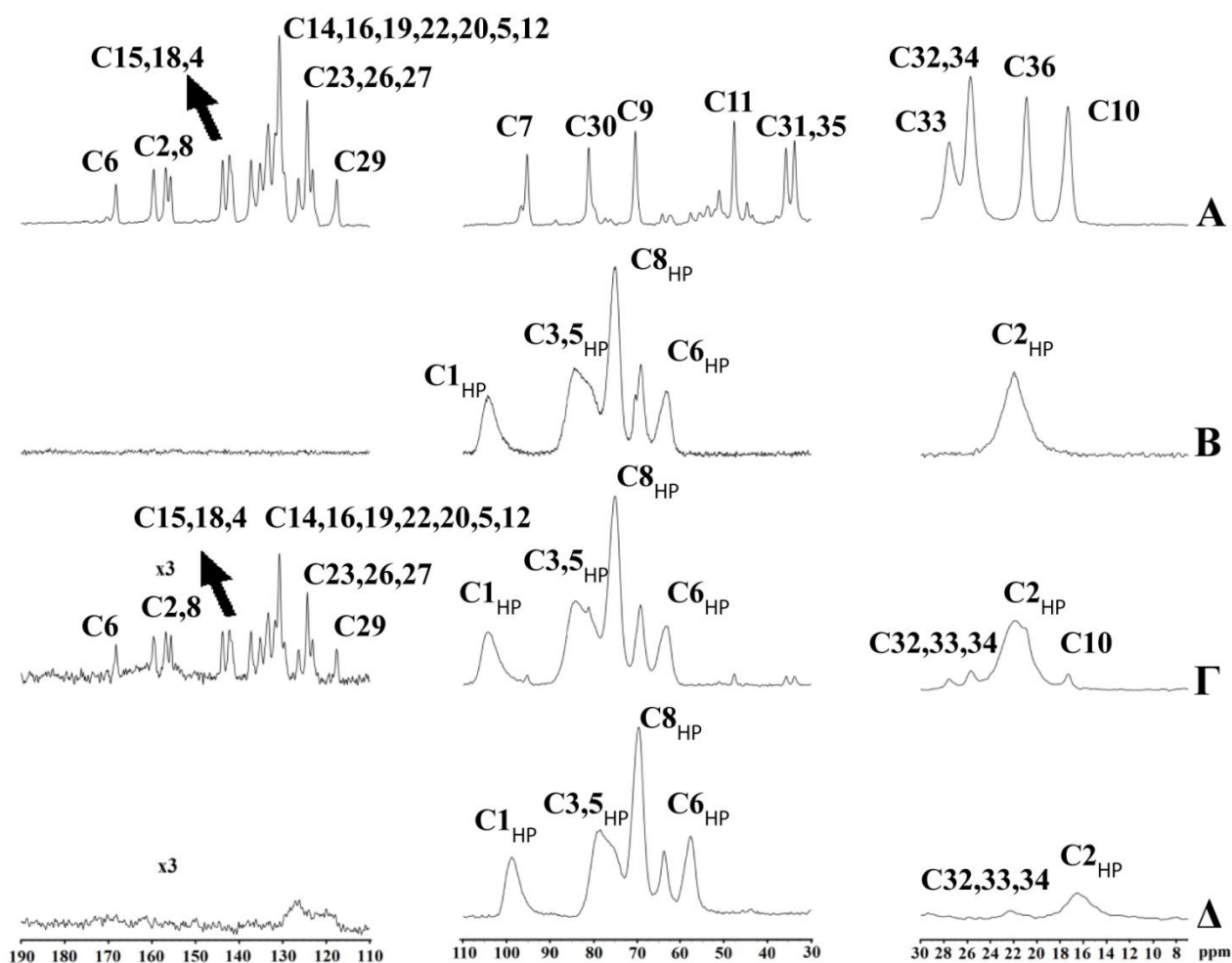
Στην περιοχή 30-110 ppm παρατηρούνται διαφορές μεταξύ του μιγματος και του συμπλόκου. Πρώτον, όλες οι κορυφές του συμπλόκου μετατοπίζονται στο υψηλότερο πεδίο σε σχέση με εκείνο του μίγματος. Παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των κορυφών του φαρμάκου. Στο μίγμα, παρατηρείται μια μικρή κορυφή του άνθρακα C11 (περίπου στα 50 ppm) της CAN. Στο σύμπλοκο (Σχήμα 50Δ) αυτή η κορυφή μετατοπίζεται περαιτέρω σε περιοχές μεγαλύτερης προάσπισης και διευρύνεται σημαντικά, υποδεικνύοντας τις διαφορετικές αλληλεπιδράσεις στα δύο δείγματα.

Οι σημαντικότερες διαφορές μεταξύ των δύο δειγμάτων παρατηρούνται στην περιοχή 110-220 ppm. Στο μίγμα (Σχήμα 50Γ) παρατηρούνται όλες οι κορυφές του φαρμάκου, αν και χαμηλότερης έντασης και οι χημικές μετατοπίσεις μετατοπίζονται συστηματικά ελαφρώς στο πεδίο μεγαλύτερης προάσπισης. Η αναγνώριση των κορυφών παρουσιάζεται στον Πίνακα 19. Στο σύμπλοκο οι κορυφές αυτής της περιοχής διευρύνθηκαν και η διακριτική ικανότητα ελαττώθηκε.

Πίνακας 19 Χημικές μετατοπίσεις της CAN σε υγρής κατάστασης NMR (DMSO), σε στερεάς κατάστασης NMR, σε μίγμα CAN/HP-β-CD και στο σύμπλοκο CAN-HP-β-CD.

| Άνθρακας της καντεσαρτάνης | DMSO (Varian 600 MHz, 300 K | ssNMR 600 MHz Καντεσαρτάνη 310 K | Μίγμα | Σύμπλοκο |
|----------------------------|--------------------------------------|---|-------------|-------------|
| 27 | 14,84 | 16,9 | 16,9 | 17,4 |
| 11 | 46,71 | 49,2 | 49,1 | 46,9-50,8 |
| 26 | 66,94 | 69,5 | - | - |
| 7 | 117,02 | 118,3 | 117,2-118,7 | 121,5-134,8 |

| | | | | |
|-------------|--------|---|-------------|-------------|
| 9 | 121,14 | 122,8 (123,6-125,1) | 121,9-125,2 | 121,5-134,8 |
| 10 | 121,88 | 122,8 (121,6-125,1) | 121,9-125,2 | 121,5-134,8 |
| 8 | 123,90 | 122,8 (121,6-125,1) | 121,9-125,2 | 121,5-134,8 |
| 13/17 | 126,86 | 127,2 | 127,1 | 121,5-134,8 |
| 21 | 128,21 | 129,1-137,5 | 129,4-137,6 | 121,5-134,8 |
| 14/16 | 129,42 | 129,1-137,5 | 129,4-137,6 | 121,5-134,8 |
| 19 ή/και 22 | 131,01 | 129,1-137,5 | 129,4-137,6 | 121,5-134,8 |
| 20 | 131,50 | 129,1-137,5 | 129,4-137,6 | 121,5-134,8 |
| 5 | 131,65 | 129,1-137,5 | 129,4-137,6 | 121,5-134,8 |
| 12 | 137,18 | 129,1-137,5 (πιθανότερο είναι η 136,3 ppm) | 129,4-137,6 | 135,9-140,1 |
| 15 | 138,54 | 139,0, 140,1 | 138,3-140,7 | 135,9-140,0 |
| 18,23 | 141,37 | 142,0 | 141,5-142,6 | 141,2-144,8 |
| 4/24 | 142,05 | 143,8 , 145,2 | 143,2-144,3 | 141,2-144,8 |
| 2 | 158,67 | 157,5 , 159,4 | 156,8-160,3 | 159,6-162,3 |
| 6 | 167,92 | 170,4 | 170,5 | 174,6-187,9 |



Σχήμα 51 Αλληλεπιδράσεις της CC με την HP-β-CD. Στο σχήμα δείχνονται οι διάφορες περιοχές φάσματος ^{13}C CP/MAS (A) CC, (B) HP-β-CD, (Γ) μίγμα CC/HP-β-CD και (Δ) σύμπλοκο CC /HP-β-CD (αναλογία 1:1). Οι ταυτοποιήσεις έγιναν σύμφωνα με την βιβλιογραφία [232].

Αλληλεπιδράσεις CC με HP-β-CD

Στην περιοχή 10-30 ppm το μίγμα περιέχει και τις τέσσερις κορυφές της CC που αποδίδονται στους C31-C35 (Σχήμα 51). Όταν το προφάρμακο συμπλέκεται, οι κορυφές διευρύνουν σημαντικά και μετατοπίζονται σε υψηλότερο πεδίο. Αυτή η σημαντική διαφορά μεταξύ του ελεύθερου φαρμάκου και του συμπλόκου δεικνύει τη συμμετοχή του κυκλοεξανικού δακτυλίου του προφαρμάκου στην συμπλοκοποίηση. Αυτό το δομικό τμήμα δεν υπάρχει στη δομή της CAN. Εντονότερες διαφορές παρατηρούνται στην περιοχή 110-250 ppm. Στο μίγμα παρατηρούνται σχεδόν όλες οι κορυφές του προφαρμάκου, αν και με μικρότερη

ένταση και παρουσιάζονται ευρύτερες. Στο σύμπλοκο οι κορυφές, διευρύνονται και σχεδόν εξαφανίζονται. Επομένως οι κορυφές αυτές δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν.

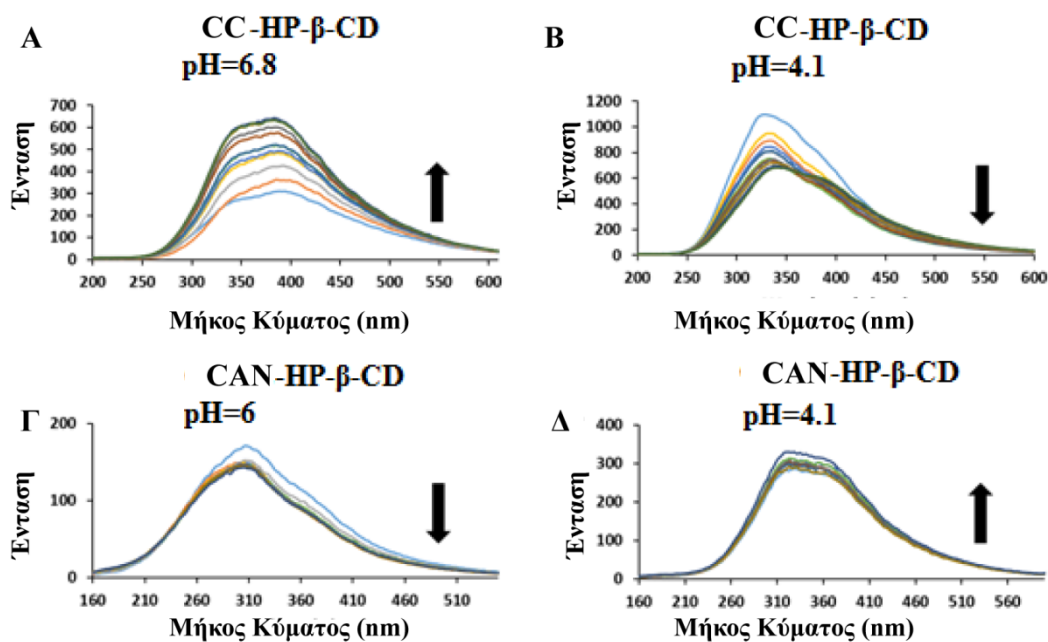
5.6 Φασματοσκοπικές μελέτες φθορισμού

Για να αξιολογηθεί περαιτέρω η αλληλεπίδραση μεταξύ CAN/CC και HP-β-CD, πραγματοποιήθηκαν φασματοσκοπικές μετρήσεις φθορισμού σταθερής κατάστασης. Όπως έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία, το φάσμα φθορισμού ενός μικρού μορίου μπορεί να μεταβληθεί κατά τον εγκλεισμό του σε μια κοιλότητα κυκλοδεξτρίνης [233]. Οι μεταβολές του φθορισμού της CAN και της CC διερευνήθηκαν προσθέτοντας διαλύματα HP-β-CD που φέρουν αυξανόμενες συγκεντρώσεις σε διάλυμα CAN/CC σταθερής συγκέντρωσης. Τόσο η CAN όσο και η CC, που διαλύθηκαν σε απεσταγμένο H₂O, εκπέμπουν φθορισμό με μέγιστα μήκη κύματος (λ_{max}) στα 373 και 405 nm, αντίστοιχα.

Όταν η συγκέντρωση της HP-β-CD αυξήθηκε στο μίγμα CC-HP-β-CD, η σχετική ένταση φθορισμού αυξήθηκε εντυπωσιακά, καθώς επέδειξε διπλάσια αύξηση παρουσία 6 mM της HP-β-CD (Σχήμα 52A). Τα διαφορετικά διαλύματα CC-HP-β-CD είχαν pH γύρω στο 6,8. Αυτή η ενίσχυση στην ένταση φθορισμού παρατηρείται συνήθως σε αλληλεπιδράσεις CD-μικρών μορίων και αποδίδεται σε μεταβολές που συμβαίνουν στο μικροπεριβάλλον του μικρού μορίου κατά τον εγκλεισμό του [234]. Εδώ, καθώς η CC μεταφέρεται από το υδατικό διάλυμα στην υδρόφοβη κοιλότητα του HP-β-CD, η κβαντική της απόδοση αυξάνεται οδηγώντας σε υψηλότερη ένταση φθορισμού. Από την άλλη πλευρά, όταν το μόριο αναμείχθηκε με HP-β-CD σε pH=4,1, παρατηρήθηκε το ακριβές αντίθετο φαινόμενο, καθώς η ένταση ακολούθησε μια διπλάσια μείωση σε μια τελική συγκέντρωση 6 mM της HP-β-CD (σχήμα 52B). Αξίζει να σημειωθεί ότι και στις δύο περιπτώσεις είτε αυξήθηκε ή μειώθηκε, η ένταση φθορισμού της CC καταλήγει στα ίδια επίπεδα έντασης που δείχνουν το τελικό φωτοφυσικό προφίλ που διαθέτει το μόριο μέσα στην κοιλότητα HP-β-CD.

Αντίθετα, το φάσμα φθορισμού της CAN δεν εμφάνισε σημαντικές μεταβολές κατά την ανάμιξη με HP-β-CD εκτός από μια ελαφριά μείωση της έντασης σε pH 6 και μια ελαφρά ενίσχυση σε pH 4,1 οι οποίες είναι ασήμαντες. Αναμφίβολα,

αυτά τα αποτελέσματα επισημαίνουν ότι η CC παρουσιάζει μια υψηλότερη τάση να εισέρχεται σε HP-β-CD, ακόμη και σε απλό διαλυμένο μίγμα.

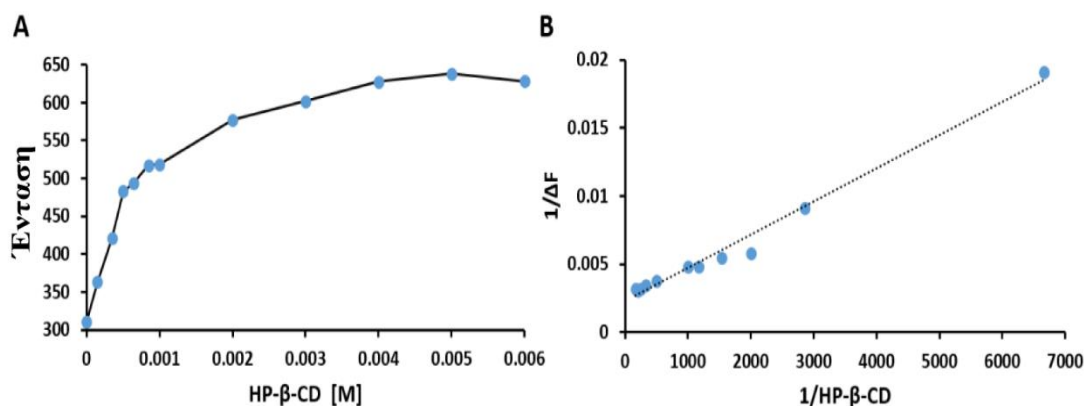


Σχήμα 52 A, B) Φάσματα φθορισμού της CC μετά την τιτλοδότηση με διάφορες συγκεντρώσεις HP-β-CD (0, 0,15, 0,35, 0,5, 0,65, 0,85, 1, 2, 3, 4, 5, 6 mM) και pH 6.8 και 4.1, αντίστοιχα. C, D) Φάσματα φθορισμού του CAN μετά την τιτλοδότηση με διάφορες συγκεντρώσεις HP-β-CD.

Τέλος, η σταθερά πρόσδεσης μεταξύ CC και HP-β-CD εκτιμήθηκε με βάση τις μεταβολές εκπομπής του φάσματος της CC μετά την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων HP-β-CD. Συγκεκριμένα, η ένταση φθορισμού στα 403 nm (λ_{max}) κάθε μέτρησης καταγράφηκε γραφικά έναντι των συγκεντρώσεων 2-HP-β-CD (Σχήμα 53A). Στη συνέχεια, μετά από μια γραμμική προσαρμογή, σχεδιάστηκε η γραφική παράσταση διπλών αντιστρόφων (Lineweaver-Burk) των δεδομένων (Σχήμα 53B) και η σταθερά πρόσδεσης προήλθε από την εξίσωση Benesi-Hildebrand:

Η γραφική παράσταση διπλών αντιστρόφων επιβεβαιώνει τη στοιχειομετρία 1:1 της CC με την HP-β-CD και η σταθερά πρόσδεσης υπολογίστηκε ίση με 1200 M^{-1} , υποδεικνύοντας μια μέτρια συγγένεια μεταξύ των δύο μορίων που ευθυγραμμίζεται με την εκτιμώμενες τιμές παρόμοιων αλληλεπιδράσεων [225, 235]. Ο υπολογισμός της σταθεράς πρόσδεσης μεταξύ CAN και HP-β-CD δεν

ήταν εφικτός λόγω των ασήμαντων μεταβολών στην ένταση φθορισμού της CAN μετά την προσθήκη της κυκλοδεξτρίνης.



Σχήμα 53 A) Φθορισμομετρικές εντάσεις της CC στα 430 nm με την προσθήκη διάφορων συγκεντρώσεων HP-β-CD B) Διπλό αντίστροφο διάγραμμα (double reciprocal plot) του ίδιου πειράματος.

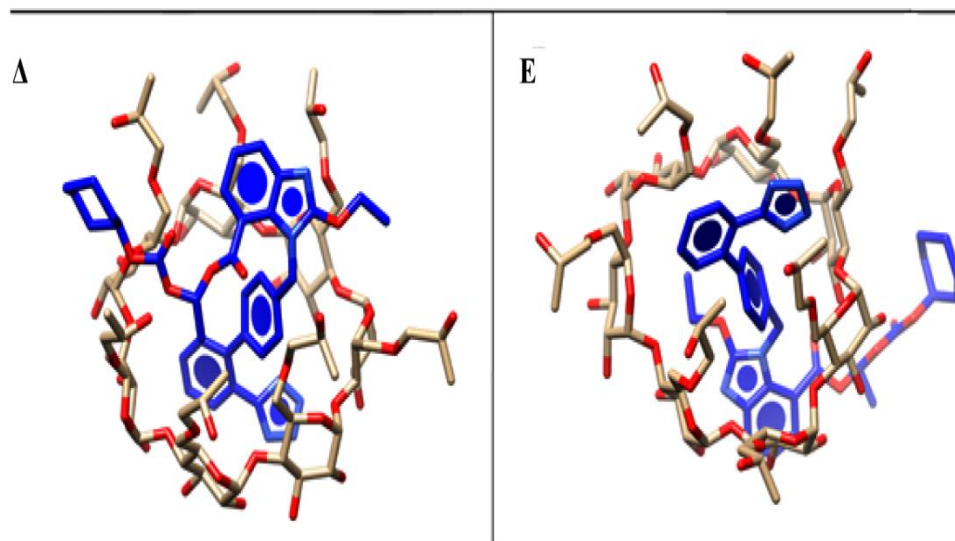
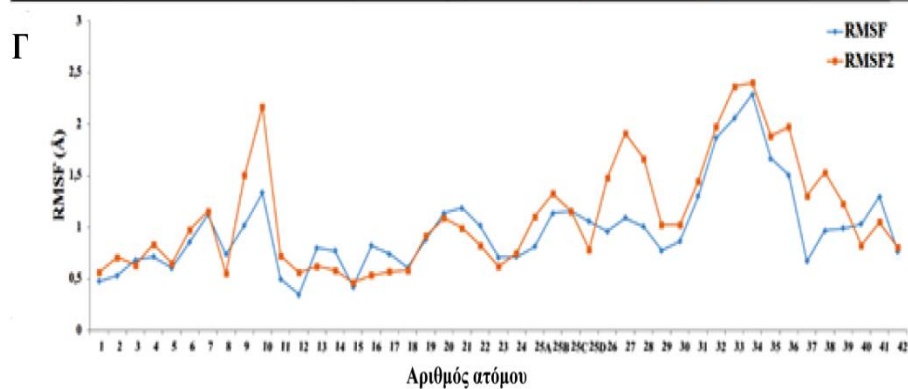
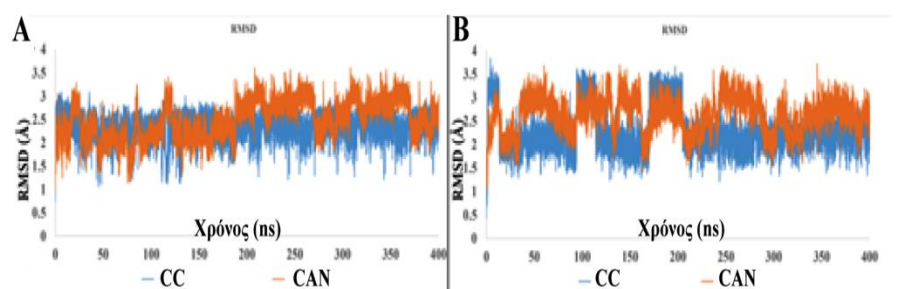
5.7 Μοριακή δυναμική συμπλόκου CC-HP-β-CD:

Οι προσομοιώσεις της πρόσδεσης της CC εντός της κοιλότητας HP-β-CD υποδηλώνουν την ισοδύναμη ύπαρξη δύο τρόπων δέσμευσης όπως έχει αναφερθεί από τους Al Omari et al. [236]. Στην πρώτη προσέγγιση το τμήμα βενζιμιδαζολίου προσανατολίζεται προς τις 2-υδροξυπροπυλικές ομάδες (Προσέγγιση A) ενώ στη δεύτερη προσέγγιση η μονάδα διφαινυλοτετραζολίου προσανατολίζεται προς τις 2-υδροξυπροπυλικές ομάδες (Προσέγγιση B). Προκειμένου να αξιολογηθεί η σταθερότητα και οι θερμοδυναμικές ιδιότητες και των δύο τρόπων δέσμευσης διεξήχθησαν προσομοιώσεις MD και για τις δύο προσεγγίσεις. Οι μέσες τετραγωνικές αποκλίσεις των ριζών (RMSD) και των δύο προσομοιώσεων παριστάνονται στο Σχήμα 54. Και οι δύο προσεγγίσεις δείχνουν σημαντική σταθερότητα του συστήματος. Η ευκαμψία της CC στο εσωτερικό της κοιλότητας εξετάστηκε με τον υπολογισμό της μέσης τετραγωνικής ρίζας διακυμάνσεων (RMSF) των βαρέων ατόμων (C, N, O) του μορίου (Σχήμα 54Γ). Τα άτομα με αριθμό 30 (στο τμήμα βενζιμιδαζολίου), 35 (στην αλυσίδα αλκυλίου) και 38, 42, 43, 44 (στο τμήμα της σιλεξετίλης) παρουσιάζουν το υψηλότερο RMSF και στις δύο προσομοιώσεις. Το τμήμα διφαινυλοτετραζολίου δείχνει σχεδόν να ακινητοποιείται. Τα στιγμιότυπα των

συστημάτων μετά από 400 ns (Σχήματα 54Δ και 54Ε) δείχνουν ότι και στις δύο προσεγγίσεις η διφαινυλική τετραζόλη είναι τοποθετημένη μέσα στην κοιλότητα της HP-β-CD. Η ανάλυση των δεσμών υδρογόνου έδειξε ότι οι δεσμοί αναπτύσσονται μόνο για μικρό χρονικό διάστημα μεταξύ CC και HP-β-CD (δεσμοί υδρογόνου με ποσοστό κατάλειψης 20% ή μικρότερο) που δείχνει ότι η ενθυλάκωση του τμήματος διφαινυλο-τετραζόλης οφείλεται κυρίως σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

Η ενέργεια πρόσδεσης του συμπλόκου CC-HP-β-CD για την προσέγγιση A, όπως υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας υπολογισμούς MM-PBSA, ήταν $\Delta G_{\text{πρόσδεσης}} = -6,96$ kcal/mol, ενώ η ενθαλπία του συστήματος ήταν -34,29 kcal/mol. Οι αντίστοιχες τιμές για το σύμπλοκο στην προσέγγιση B ήταν $\Delta G_{\text{πρόσδεσης}} = -6,70$ kcal/mol και $\Delta H = -30,62$ kcal / mol (Πίνακας 20).

Αυτές οι τιμές δείχνουν ότι: i) Η δέσμευση της CC σε HP-β-CD είναι ενεργειακά ευνοϊκή στις δύο προσεγγίσεις, ii) Η δέσμευση οδηγείται κυρίως από τις αλληλεπιδράσεις van der Waals, ενώ ο μη πολικός όρος διάσπασης συνεισφέρει ευνοϊκά. iii) Η ενθαλπική συμβολή είναι πιο ευνοϊκή για την προσέγγιση A, η εντροπική συνεισφορά εξισορροπεί τις διαφορές. Αυτά τα ευρήματα συμφωνούν με αυτά που αναφέρονται στη βιβλιογραφία [236].



Σχήμα 54 RMSD των ατόμων σε σχέση με τον χρόνο για CC και κυκλοδεξτρίνη στην προσέγγιση A (A) και προσέγγιση B (B). Ρίζες μέσης τετραγωνικής διακύμανσης (RMSF) βαρέων ατόμων της CC (C). Στιγμιότυπα του συμπλόκου CC-HP-β-CD μετά από 400 ns για την προσέγγιση A (D) και προσέγγιση B (E).

Πίνακας 20 Μέσες τιμές ενέργειας για το σύμπλοκο CC-HP-β-CD όπως προκύπτουν από τους υπολογισμούς MMPBSA.

| Ενέργεια | CC Προσανατολισμός A | | CC Προσανατολισμός B | |
|--|-------------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|
| | Μέση Τιμή (kcal/mol) | ±SEM ¹ | Μέση Τιμή (kcal/mol) | ±SEM ¹ |
| ΔE_{vdW} | -57,32 | 0,024 | -52,76 | 0,014 |
| $\Delta E_{\eta\lambda\epsilon\kappa}$ | -14,38 | 0,043 | -16,34 | 0,026 |
| $\Delta E_{\alpha\epsilon\rho\iota\omicron}$ (= $\Delta E_{\eta\lambda\epsilon\kappa} + \Delta E_{vdW}$) | -71,70 | 0,049 | -69,10 | 0,028 |
| ΔG_{PB} | 42,46 | 0,038 | 42,82 | 0,026 |
| $\Delta G_{\kappa\omicron\iota\lambda\omicron\tau\eta\tau\alpha\varsigma}$ | -5,05 | 0,001 | -4,34 | 0,000 |
| $\Delta G_{\delta\iota\alpha\lambda}$ (= $\Delta E_{PB} + \Delta E_{\delta\iota\alpha\lambda}$) | 37,41 | 0,038 | 38,48 | 0,025 |
| $\Delta H_{\pi\rho\omicron\sigma\delta\epsilon\sigma\eta\varsigma}$ (= $\Delta E_{\alpha\epsilon\rho\iota\omicron} + \Delta G_{\delta\iota\alpha\lambda}$) | -34,29 | 0,027 | -30,62 | 0,020 |
| $-T\Delta S$ | 27,33 | 0,058 | 23,92 | 0,037 |
| $\Delta G_{\pi\rho\omicron\sigma\delta\epsilon\sigma\eta\varsigma}$ | -6,96 | 0,040 ² | -6,70 | 0,028 ² |

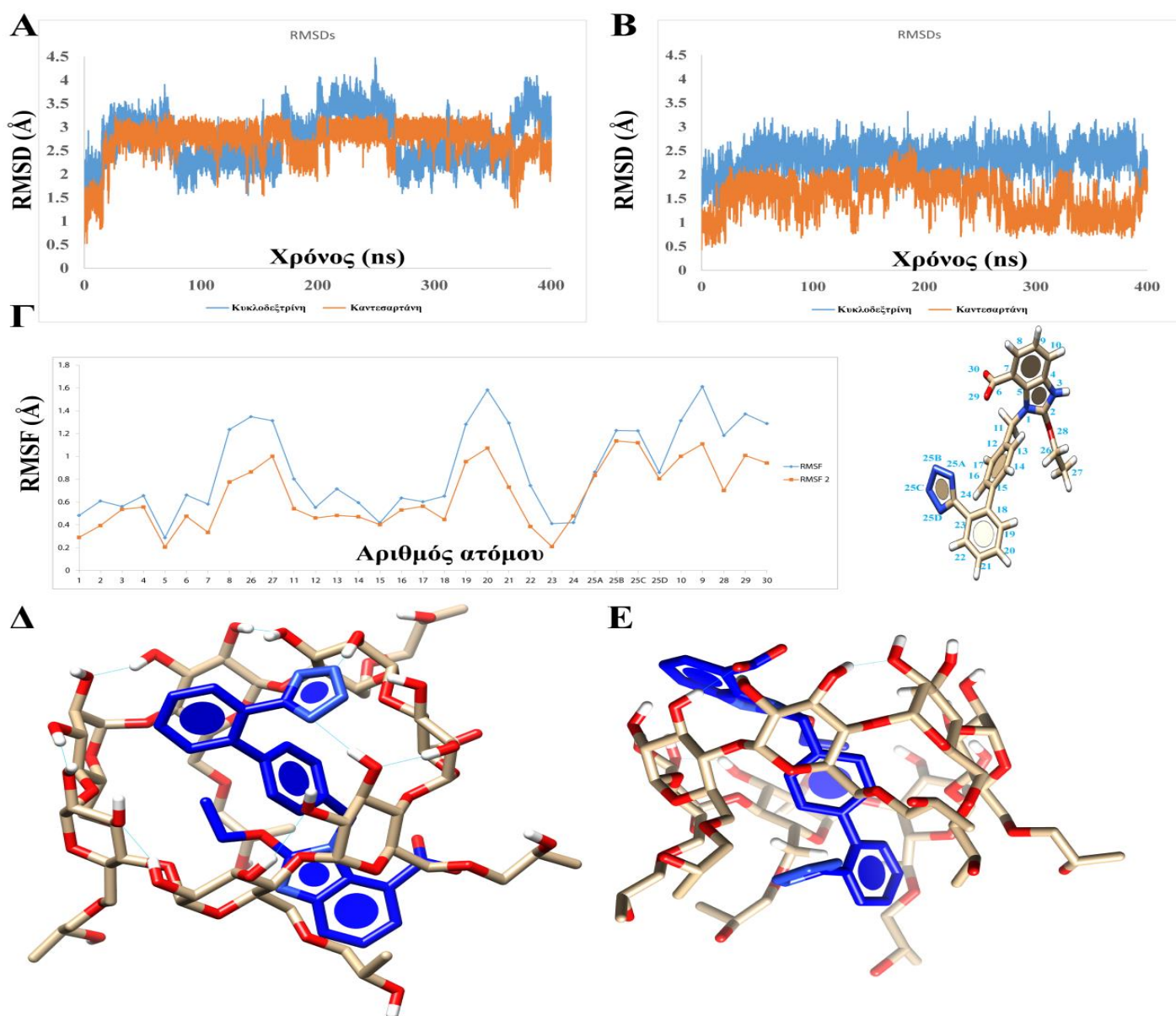
¹Αναμενόμενο σφάλμα του μέσου όρου (SEM): SEM = Τυπική απόκλιση / \sqrt{N} . N είναι ο αριθμός των στιγμιότυπων τροχιάς που χρησιμοποιήθηκαν κατά τους υπολογισμούς MM-PBSA (4000 στιγμιότυπα για την εντροπία και 40000 στιγμιότυπα για τα υπόλοιπα).

²Ένα τυπικό σφάλμα του μέσου όρου

5.8 Μοριακή δυναμική συμπλόκου CAN-HP-β-CD:

Όπως προηγουμένως, έγιναν προσομοιώσεις MD και για τις δυο πιθανές προσεγγίσεις. Τα προκύπτοντα RMSDs (Σχήματα 55A και B) δείχνουν ότι το σύστημα σταθεροποιείται μετά από ~20 ns. Ένα στιγμιότυπο του συμπλόκου CAN-HP-β-CD στο τέλος της προσομοίωσης στην προσέγγιση A παριστάνεται στο σχήμα 55Γ. Αντίθετα με την περίπτωση του συμπλόκου CC-HP-β-CD, το τμήμα τετραζολίου της CAN αναπτύσσει πολλαπλούς δεσμούς υδρογόνου με τις ομάδες υδροξυλίου της HP-β-CD στις θέσεις 2 και 3 με καταλήψεις που

προσεγγίζουν το 50% του χρόνου προσομοίωσης. Αντίστοιχα, το σύμπλοκο στην προσέγγιση B (Σχήμα 55Δ) σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ της ομάδας καρβοξυλίου της CAN και των ομάδων υδροξυλίου στις θέσεις 2 και 3 της HP-β-CD (καταλήψεις που προσεγγίζουν το 22% του χρόνου προσομοίωσης). Στην περίπτωση αυτή παρατηρούνται επίσης δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της μονάδας τετραζολίου και των υδροξυλομάδων των υδροξυπροπυλικών ομάδων (δεσμοί που προσεγγίζουν το 19% του χρόνου προσομοίωσης).



Σχήμα 55 Η μέση τετραγωνική ρίζα απόκλισης (RMSD) όλων των ατόμων σε συνάρτηση με τον χρόνο για την καντεσαρτάνη και κυκλοδεξτρίνη στον προσανατολισμό A (A) και B (B). Ρίζες μέσης τετραγωνικής διακύμανσης (RMSF) βαρέων ατόμων CAN (Γ). Στιγμιότυπο

του συμπλόκου CAN-HP-β-CD μετά από 400 ns στον προσανατολισμό A (Δ) και προσανατολισμό B (Ε).

Η ενέργεια πρόσδεσης του συμπλόκου CAN-HP-β-CD για την προσέγγιση A, όπως υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας υπολογισμούς MM-PBSA, ήταν 3,11 kcal/mol, ενώ η ενθαλπία του συστήματος ήταν -19,38 kcal/mol. Οι αντίστοιχες τιμές για το σύμπλοκο στην προσέγγιση B είναι $\Delta G_{\text{πρόσδεσης}} = -1,55$ kcal/mol και $\Delta H = -25,05$ kcal / mol (Πίνακας 21). Αυτές οι τιμές δείχνουν ότι η ενθυλάκωση της CAN με την HP-β-CD είναι ευνοϊκή μόνο στην προσέγγιση B. Η διαφορά αυτή οφείλεται κυρίως στον ηλεκτροστατικό όρο της ενέργειας. Στην πρώτη προσέγγιση η τιμή αυτού του όρου είναι -7,05 kcal/mol, ενώ στη δεύτερη προσέγγιση είναι -17,27 kcal/mol. Μια πιθανή εξήγηση γι' αυτή τη διαφορά των 10 kcal/mol είναι η ύπαρξη περισσότερων δεσμών υδρογόνου στη δεύτερη προσέγγιση λόγω της ευνοϊκότερης θέσης της καντεσαρτάνης μέσα στην κοιλότητα της HP-β-CD.

Πίνακας 21 Μέσες τιμές ενέργειας για το σύμπλοκο CAN-HP-β-CD όπως προκύπτουν από τους υπολογισμούς MMPBSA.

| | CAN Προσανατολισμός A | | CAN Προσανατολισμός B | |
|--|--------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|
| | Μέση τιμή (kcal/mol) | \pm SEM ¹ | Μέση τιμή (kcal/mol) | \pm SEM ¹ |
| Ενέργεια | | | | |
| ΔE_{vdW} | -43,37 | 0,015 | -41,55 | 0,016 |
| $\Delta E_{\text{ηλεκ}}$ | -7,05 | 0,060 | -17,27 | 0,054 |
| $\Delta E_{\text{αέριο}}$ ($=\Delta E_{\text{ηλεκ}}+\Delta E_{\text{vdW}}$) | -50,42 | 0,062 | -58,82 | 0,055 |
| ΔG_{PB} | 34,97 | 0,056 | 37,58 | 0,050 |
| $\Delta G_{\text{κοιλότητας}}$ | -3,93 | 0,000 | -3,80 | 0,000 |
| * $\Delta G_{\text{διαλ}}$ ($=\Delta E_{\text{PB}}+\Delta E_{\text{solV}}$) | 31,04 | 0,056 | 33,78 | 0,050 |
| $\Delta H_{\text{πρόσδεσης}}$ ($=\Delta E_{\text{αέριο}}+\Delta G_{\text{διαλ}}$) | -19,38 | 0,018 | -25,05 | 0,017 |
| $-T\Delta S$ | 22,49 | 0,045 | 23,50 | 0,043 |
| $\Delta G_{\text{πρόσδεσης}}$ | 3,11 | 0,023 ² | -1,55 | 0,021 ² |

¹Αναμενόμενο σφάλμα του μέσου όρου (SEM): $SEM = \text{Τυπική απόκλιση} / \sqrt{N}$. N είναι ο αριθμός των στιγμιότυπων τροχιάς που χρησιμοποιήθηκαν κατά τους υπολογισμούς MM-PBSA (4000 στιγμιότυπα για την εντροπία και 40000 στιγμιότυπα για τα υπόλοιπα).

²Ένα τυπικό σφάλμα του μέσου όρου

Μια σύγκριση μεταξύ των τιμών των ενεργειακών συστατικών του συμπλόκου CC-HP-β-CD και αυτών του συμπλόκου CAN-HP-β-CD φανερώνει ότι η ενέργεια Van der Waals μειώνεται κατά περίπου 14 kcal/mol στην περίπτωση της καντεσαρτάνης. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην απουσία του τμήματος της σιλεξετίλης. Ο ηλεκτροστατικός όρος της ενέργειας δεσμεύσεως είναι ευνοϊκότερος στην περίπτωση της καντεσαρτάνης (προσέγγιση B) όταν συγκρίνεται με τον ίδιο όρο και στις δύο προσεγγίσεις της CC. Αυτό οφείλεται στην ύπαρξη ενός δεύτερου φορτισμένου τμήματος στην περίπτωση της καντεσαρτάνης (της καρβοξυλομάδας) καθώς και στην κατάλληλη θέση της καντεσαρτάνης στη δεύτερη προσέγγιση για να αναπτυχθούν δεσμοί υδρογόνου με τις περισσότερες ομάδες υδροξυλίου της τροποποιημένης κυκλοδεξτρίνης. Ενώ στην περίπτωση της CC το τετραζόλιο ακινητοποιήθηκε μέσα στην κοιλότητα της CD, στην περίπτωση της καντεσαρτάνης το τμήμα αυτό ήταν ευκίνητο.

5.9 Δοκιμασία σταθερότητας πλάσματος

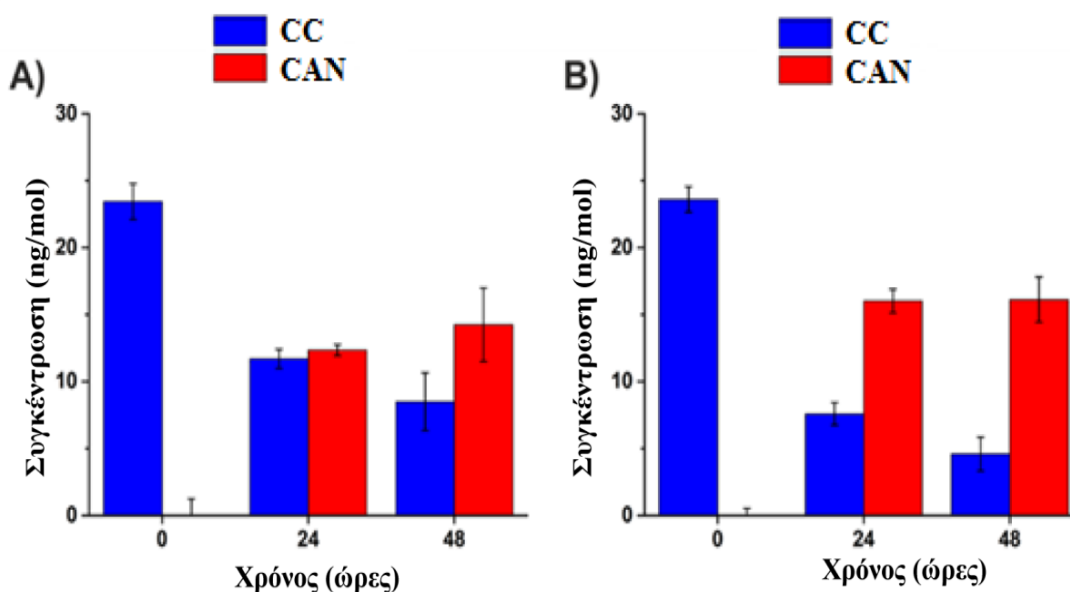
Αφού αξιολογήθηκε η σταθερότητα του συμπλόκου της CC με HP-β-CD, εξετάστηκε στη συνέχεια η σταθερότητα σε πλάσμα του ανθρώπου και η ταχύτητα με την οποία η CC απελευθερώθηκε από το σύμπλοκο και υδρολύθηκε στην CAN. Επιπλέον, προκειμένου να διερευνηθεί αν υπήρχε διαφορετική συμπεριφορά της ελεύθερης CC όταν επώαστηκε σε ανθρώπινο πλάσμα, δημιουργήθηκε ένα δεύτερο πείραμα σταθερότητας στο πλάσμα. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν πρωτόκολλα LC-MS για την παρακολούθηση της σταθερότητάς τους, καθώς επίσης και για την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσής τους στο ανθρώπινο πλάσμα κατά τρόπο που εξαρτάται από τον χρόνο.

Προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η ανάλυση για πιο έντονα σχήματα κορυφής και για καλύτερο διαχωρισμό, πραγματοποιήθηκαν αρκετές δοκιμές χρωματογραφίας. Η παρουσία 0,1% μυρμηκικού οξέος στη φάση A και B

βελτίωσε τα σχήματα αιχμής και αύξησε το σήμα για όλες τις ενώσεις. Ο συνολικός χρόνος εκτέλεσης ήταν 6 λεπτά και ο χρόνος έκλουσης για την CC ήταν 3,2 λεπτά ενώ για την CAN και IRB 2,4 λεπτά.

Συγχρονισμένη φασματομετρία μάζας χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των στοχευόμενων ενώσεων σε θετικό ιοντισμό ηλεκτροψεκασμού. Κατά τη διάρκεια της απευθείας έγχυσης σε φασματόμετρο μάζας, βρέθηκαν οι πιο άφθονες μεταβάσεις όσον αφορά την ευαισθησία: m/z 611,2 \rightarrow 423,1 και 611,2 \rightarrow 349,1 για CC, 441,2 \rightarrow 147,2 και 441,2 \rightarrow 255,1 για CAN, 429,2 \rightarrow 207,1 και 429,2 \rightarrow 195,2 για το IRB. Οι παράμετροι ESI όπως ο νεφελοποιητής, η τάση ψεκασμού και η θερμοκρασία θερμαινόμενου αισθητήρα βελτιστοποιήθηκαν προκειμένου να ληφθεί μια συνεπής απόκριση για όλους τους αναλύτες.

Οι ρυθμοί με τους οποίους η CC του συμπλόκου απελευθερώνεται και υδρολύεται σε CAN μετά την επώαση σε ανθρώπινο πλάσμα για 0, 24 και 48 ώρες παρουσιάζεται στο Σχήμα 56A. Αντίστοιχα, ο ρυθμός με τον οποίο η ελεύθερη CC υδρολύεται σε CAN σε ανθρώπινο πλάσμα απεικονίζεται στο Σχήμα 56B. Όπως αναμενόταν σε 0 ώρες, δεν υπήρχε καμία ποσότητα CAN σε αμφότερους τους προσδιορισμούς σταθερότητας στο πλάσμα. Είναι αξιοσημείωτο ότι μετά από 48 ώρες επώασης πλάσματος και σε αμφότερες τις περιπτώσεις εξακολουθεί να υπάρχει μια μικρή ποσότητα CC που αποκαλύπτει ένα μάλλον αργό ρυθμό αποδόμησης, ωστόσο, στην περίπτωση της CC που προέρχεται από το CC-HP-β-CD, ο ρυθμός αποικοδόμησης ήταν βραδύτερος. Αυτή η διαφορά στο προφίλ σταθερότητας στο πλάσμα θα μπορούσε να δικαιολογηθεί από το γεγονός ότι η CC στο σύμπλοκο προστατεύεται από την HP-β-CD, εμποδίζοντας έτσι την ενζυματική υδρόλυση της CC σε CV-174

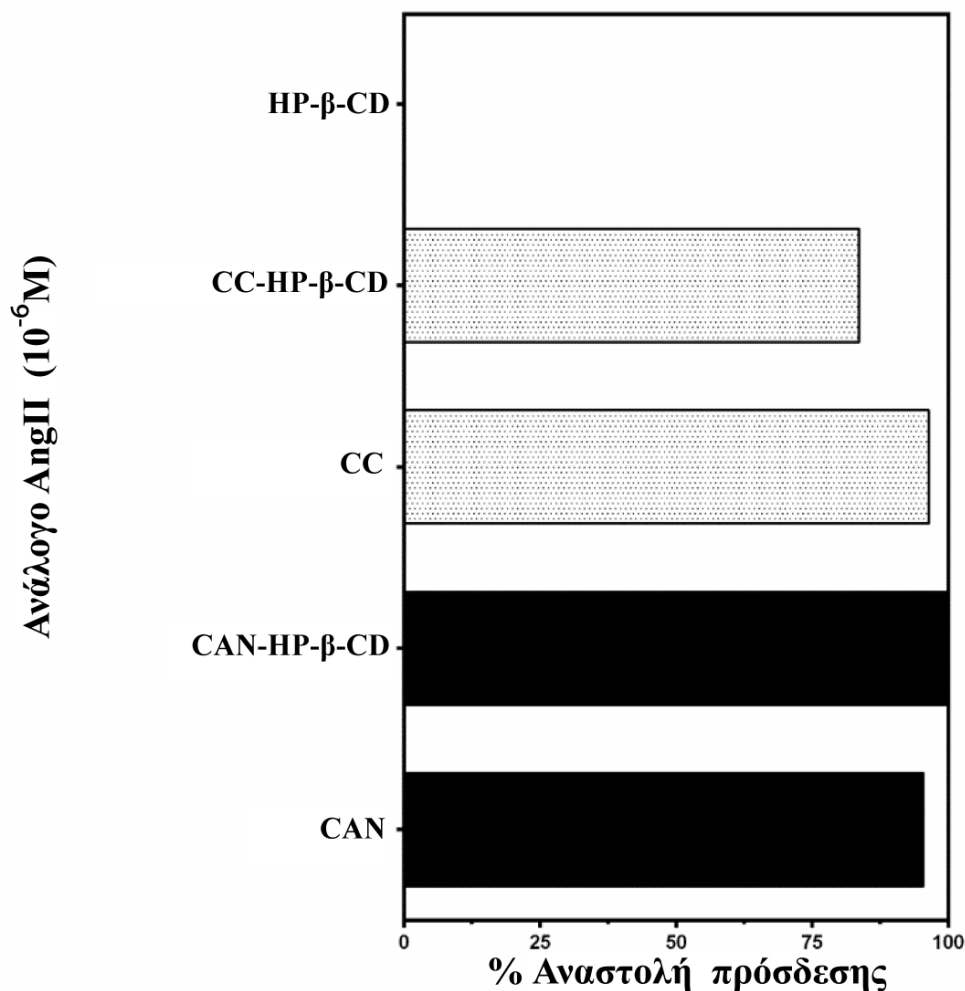


Σχήμα 56 Συγκέντρωση CC και CAN μετά από επώαση σε ανθρώπινο πλάσμα στους 37° C του A) συμπλόκου CC-HP-β-CD και B) CC.

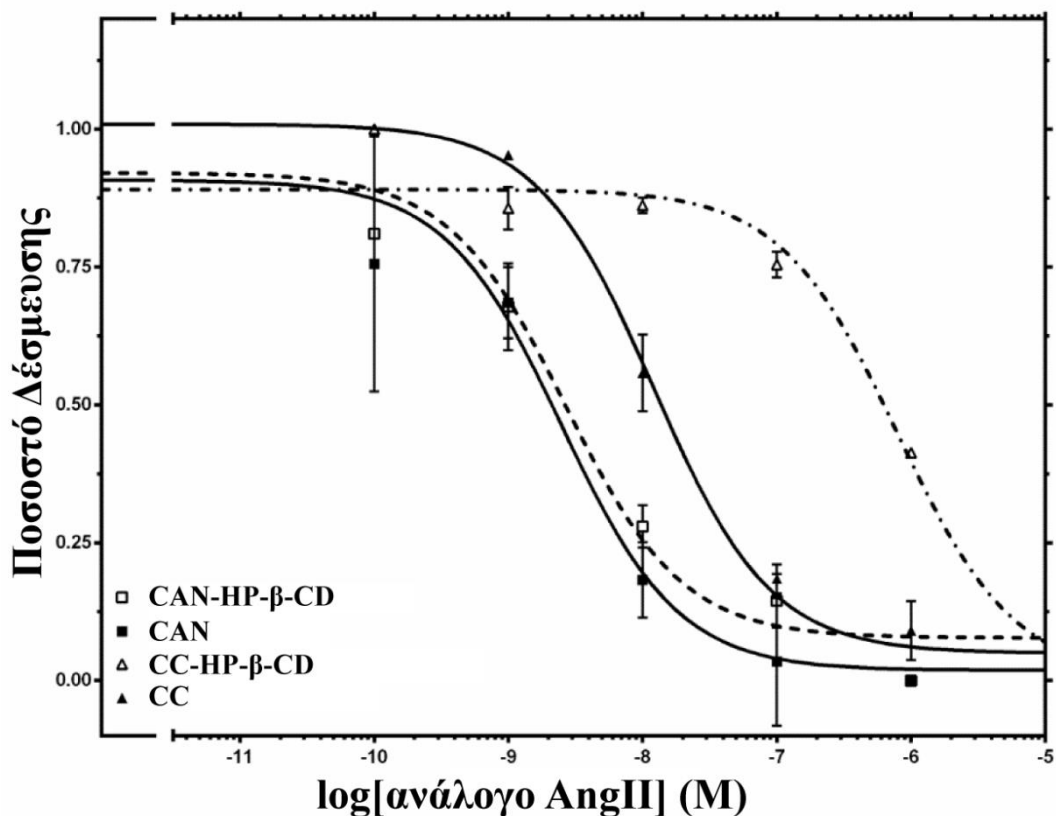
5.10 Πρόσδεση των αναλόγων AngII με τον ανθρώπινο υποδοχέα AT1.

Για να ελεγχθεί αν το ανάλογο AngII, οι ανταγωνιστές CAN ή CC ή η HP-β-CD ή τα σύμπλοκα φαρμάκων με HP-β-CD δεσμεύονται στον ανθρώπινο υποδοχέα AT1, προσδιορίσθηκε αρχικά η ικανότητά τους (στην απλή συγκέντρωση 1000 nM) για την αναστολή της ειδικής δέσμησης [¹²⁵I-Sar1-Ile8] AngII σε μεμβράνες από κύτταρα HEK 293. Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν σταθερά τον υποδοχέα AT1 σε πειράματα δέσμησης που εκτελούνται υπό συνθήκες ισορροπίας. Η HP-β-CD δεν δεσμεύεται στον ανθρώπινο υποδοχέα AT1. Αντίθετα, η CAN και η CC, με ή χωρίς HP-β-CD ανέστειλε την [¹²⁵I-Sar1-Ile8] με ειδική δέσμηση κατά 84-100% (Σχήμα 57). Οι ανταγωνιστές και τα σύμπλοκά τους με HP-β-CD χαρακτηρίσθηκαν περαιτέρω φαρμακολογικώς με προσδιορισμό των ικανοτήτων πρόσδεσης τους (-logK_i) για τον υποδοχέα AT1 σε πειράματα ανταγωνισμού. Όπως παριστάνεται στο Σχήμα 58, η προσθήκη της HP-β-CD στην CAN σε αναλογία 1:1, σχηματίζοντας έτσι σύμπλοκο CAN-HP-β-CD δεν αλλοίωσε σημαντικά τις ιδιότητες πρόσδεσης της CAN. Συγκεκριμένα, η ικανότητα πρόσδεσης της CAN-HP-β-CD (K_i = 4,07 ± 1,68 nM) για τον υποδοχέα AT1 ήταν παρόμοια με εκείνη της CAN (K_i = 4,32 ± 2,09 nM). Αντίθετα, η προσθήκη HP-β-CD σε CC σε αναλογία 1:1, σχηματίζοντας έτσι το σύμπλοκο CC-HP-β-CD

μείωσε την ικανότητα δέσμευσης της CC 30 φορές. Ειδικότερα, οι ικανότητες πρόσδεσης των CC-HP-β-CD και CC ήταν $K_i = 470,2 \pm 242,6$ nM και $K_i = 15,56 \pm 5,12$ nM, αντίστοιχα.



Σχήμα 57 Ανάλογο AngII και σύμπλοκα ανταγωνιστών με HP-β-CD προς δέσμευση στον ανθρώπινο υποδοχέα AT1. Η αναστολή ειδικής δέσμευσης [125 I-Sar1-Ile8] AngII έγινε με 1000 nM ανταγωνιστών και τα σύμπλοκά τους με HP-β-CD ή HP-β-CD, όπως περιγράφεται στο "Υλικά και Μέθοδοι", σε μεμβράνες από κύτταρα HEK 293 που εκφράζουν σταθερά τον ανθρώπινο υποδοχέα AT1. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν την % αναστολή της ραδιοεπισημασμένης Ang II ειδικής δέσμευσης από τους ανταγωνιστές.



Σχήμα 58 Ισόθερμες καμπύλες δέσμευσης των ανταγωνιστών AngII ή των συμπλοκών τους με τον ανθρώπινο υποδοχέα AT1. Διεξήχθη ανταγωνισμός της ειδικής δέσμευσης [¹²⁵I-Sar1-Ile8] AngII με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ανταγωνιστών AngII, όπως περιγράφεται στο "Υλικά και Μέθοδοι", σε μεμβράνες από κύτταρα HEK 293 που εκφράζουν σταθερά τον ανθρώπινο υποδοχέα AT1. Τα δεδομένα προκύπτουν από αντιπροσωπευτικό πείραμα που διεξήχθη 2 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Τα δεδομένα ήταν κατάλληλα για να χρησιμοποιηθεί μοντέλο ανταγωνισμού μίας θέσης με μη γραμμική παλινδρόμηση.

5.11 Συμπεράσματα

Σε αυτή τη μελέτη παρασκευάστηκαν σύμπλοκα CAN και CC με HP-β-CD και χαρακτηρίστηκαν με τεχνικές MS-ESI και ¹³C-CP/MAS. Τα φάσματα ¹³C-CP/MAS των συμπλοκών διέφεραν σημαντικά από αυτά των μιγμάτων που παρασκευάστηκαν σε αναλογία 1:1 φαρμάκου-HP-β-CD. Οι διαφορές χημικής μετατόπισης που οφείλονταν στη CAN ή CC στα σύμπλοκα ήταν μεγαλύτερες και τα ημίσεια εύρη των κορυφών πιο διευρυμένα. Οι εντάσεις των κορυφών των φαρμάκων μειώνονταν ή εξαφανίζονταν κατά τη συμπλοκοποίηση ως

αποτέλεσμα των ευνοϊκών αλληλεπιδράσεων μεταξύ φιλοξενούμενου φαρμάκου και του ξενιστή HP-β-CD.

Μελέτες φθορισμού έδειξαν ότι η CC παρουσιάζει υψηλότερη τάση να εισέρχεται στην HP-β-CD από την CAN. Η σταθερά πρόσδεσης υπολογίστηκε ίση με 1200 M^{-1} δείχνοντας μία μέτρια συγγένεια.

Η σταθερότητα πλάσματος για την CC ενισχύθηκε σαφώς στην συμπλοκοποιημένη μορφή σε σχέση με την ελεύθερη μορφή. Αυτό αποτελεί άμεση ένδειξη ότι η συμπλοκοποίηση προστατεύει το φάρμακο από την ενζυματική υδρόλυση.

Οι προσομοιώσεις MD για 400 ns και MM-PBSA επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα του ssNMR και παρείχαν θερμοδυναμικούς παραμέτρους που υποδεικνύουν τη σταθερότητα και τη φύση των δυνάμεων που διέπουν την συμπλοκοποίηση όταν εισάγονται μόρια στο σύμπλοκο με διαφορετικό προσανατολισμό δέσμησης.

Τα σύμπλοκα έπειτα αξιολογήθηκαν *in vitro*. Τα αποτελέσματα είναι πολύ ελπιδοφόρα. Το σύμπλοκο της CAN είχε παρόμοια K_i συγκριτικά με εκείνη της καθαρής του μορφής, ενώ η CC ήταν πιο αποτελεσματική στην καθαρή της μορφή. Είναι προφανές ότι η CAN απελευθερώνεται πιο αποτελεσματικά σε σύγκριση με την CC στο περιβάλλον διπλής στιβάδας λιπιδίων προκειμένου να φθάσει στην ενεργή θέση σύνδεσης μέσω πλευρικής διάχυσης στη λιπιδική μήτρα ή απευθείας από τη θέση του υποδοχέα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με τα αποτελέσματα MM-PBSA που δείχνουν ότι η CC έχει μια ευνοϊκότερη δέσμηση με την κυκλοδεξτρίνη. Αυτό συνεπάγεται ότι η CC προσδένεται ισχυρότερα στην κυκλοδεξτρίνη και δεν αποδεσμεύεται εύκολα από αυτό το περιβάλλον. Ωστόσο, η δέσμηση δεν ευνοείται στην περίπτωση της CAN και εύκολα αποδεσμεύεται από το περιβάλλον κυκλοδεξτρίνης.

Γενικά συμπεράσματα

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν τα σύμπλοκα λιπόφιλων φυσικών προϊόντων και φαρμάκων με κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιώντας βιοφυσικές και υπολογιστικές μεθόδους.

Τα σύμπλοκα παρασκευάστηκαν με λυοφιλοποίηση και ταυτοποιήθηκαν με τη φασματομετρία μάζας επαληθεύοντας την θεωρητικώς υπολογιζόμενη 1:1 αναλογία. Η αρχιτεκτονική των συμπλόκων καθώς και ο προσανατολισμός των φαρμακευτικών μορίων εντός των συμπλόκων μελετήθηκε εκτενώς με τη χρήση υγρής και στερεής φασματοσκοπίας NMR, τη μέθοδο της μοριακής δυναμικής όπως και την φθορισμομετρία. Συγκεκριμένα, επαληθεύτηκε η πλήρης ενθυλάκωση των μορίων εντός της κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης λόγω της προάσπισης που παρατηρείται σε όλα τα τμήματα των μορίων. Ταυτόχρονα, με τη χρήση του προγράμματος AMBER προσομοιώθηκαν οι τροχιές των συμπλόκων σε συνάρτηση με το χρόνο εμφανίζοντας σταθερά σύμπλοκα. Οι υπολογισμοί MM-PBSA εμφάνισαν τις διακριτές ενεργειακές συνεισφορές που υπάρχουν στη συμπλοκοποίηση και αποτέλεσαν σημαντικό εργαλείο στην κατανόηση των θερμοδυναμικών παραμέτρων που διέπουν τα συστήματα αυτά.

Με τη μέθοδο ITC επαληθεύτηκαν οι θεωρητικοί υπολογισμοί και στην περίπτωση των φυσικών προϊόντων βρέθηκε και ο βέλτιστος βαθμός υποκατάστασης (υψηλός ή χαμηλός) της HP-β-CD.

Τα *in vitro* πειράματα στην περίπτωση της CAN και της CC αποκάλυψαν τη μειωμένη δραστηριότητα και αποδέσμευση στο πλάσμα του αίματος της συμπλοκοποιημένης CC ενώ στην περίπτωση της CAN δεν παρατηρείται αντίστοιχη συμπεριφορά. Τα πειράματα αυτά υποδεικνύουν ότι η συμπλοκοποιημένη CC δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φαρμακοτεχνική μορφή.

Τα δεδομένα αυτά αποτελούν σημαντική ένδειξη ότι στην περίπτωση των φυσικών προϊόντων αλλά και στα ήδη εμπορικά φαρμακευτικά μόρια, οι φαρμακοτεχνικές μορφές που περιλαμβάνουν κυκλοδεξτρίνες μπορεί να αποτελέσουν λύση στα ζητήματα μειωμένης διαλυτότητας και βιοδιαθεσιμότητας.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 22: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.

| Ξενόγλωσσος όρος | Ελληνικός Όρος |
|------------------|--|
| AngII | Αγγειοτασίνη II |
| ARB | Αναστολείς του υποδοχέα της αγγειοτασίνης II |
| CA | Καφεϊκό οξύ |
| CAN | Καντεσαρτάνη |
| CC | Σιλεξετίλη της καντεσαρτάνης |
| CD | Κυκλοδεξτρίνη |
| CGTase | Γλυκοτρανσφεράση της κυκλοδετρίνης |
| CPU | Κεντρική μονάδα επεξεργασίας |
| CSA | Ανισοτροπία χημικής μετατόπισης |
| DMSO | Διμεθυλοσουλφοξείδιο |
| DSC | Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης |
| EDTA | Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ |
| GPU | Μονάδα επεξεργασίας γραφικών |
| HP-β-CD/2HP-β-CD | Υδροξυπροπυλο-βητα-κυκλοδεξτρίνη |
| ITC | Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης |
| LC | Υγρή χρωματογραφία |
| MD | Μοριακή δυναμική |
| NSAID | Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα |
| Per os | Από το στόμα |
| PGE2 | Προσταγλαδίνη E2 |
| RA | Ροσμαρινικό οξύ |

| | |
|-------|---|
| RMSD | Ρίζα μέσης τετραγωνικής απόκλισης |
| RMSF | Διακύμανση μέσης τετραγωνικής απόκλισης |
| SEM | Αναμενόμενο σφάλμα του μέσου όρου |
| ssNMR | Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στερεής κατάστασης |

Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια

Ακρωνύμια και ανάπτυξη τους

| | |
|---------|---|
| AMBER | A ssisted M odel B uilding with E nergy R efinement |
| AngII | ANG iotensin 2 |
| ARB | A ngiotensin II R eceptor B lockers |
| CA | C affeic A cid |
| CAN | CAN desartan |
| CC | C andesartan C ilexetil |
| CD | C yclo D extrin |
| CGTase | C yclodextrin G lyco T ransfer A SE |
| COSY | CO rrelated S pectroscop Y |
| CP-MAS | C ross- P olarization- M agic A ngle S pinning |
| CPOP | C ontrolled P orosity O smotic P ump |
| CPU | C entral P rocessing U nit |
| CSA | C hemical S hift A nisotropy |
| DMSO | Di Methyl Sulf Oxide |
| DS | D egree of S ubstitution |
| DSC | D ifferential S canning C alorimetry |
| EDTA | E thylene D iamine T etraacetic A cid |
| ESI-MS | E lectro S pray I onization M ass S pectrometry |
| GAFF | G eneral A mber F orce F ield |
| GPU | G raphics P rocessing U nit |
| GROMOS | G RONingen M OLEcular S imulation |
| HP-β-CD | H ydroxy P ropyl- B eta- C yclo D extrin |
| HRMS | H igh- R esolution M ass S pectrometry |
| ITC | I sothermal T itration C alorimetry |
| LC | L iquid C hromatography |
| MD | M olecular D ynamics |
| MM-GBSA | M olecular M echanics G eneralized B orn S urface A rea |
| MM-PBSA | M olecular M echanics P oisson- B oltzmann S urface A rea |
| NOE | N uclear O verhauser E ffect |
| NSAID | N on S teroidal A nti- I nflammatory D rug |

| | |
|-------|---|
| OPLS | O ptimized P otentials for L iquid S imulations |
| PGE2 | P rosta G ladin E2 |
| PMEMD | P article M esh E wald M olecular D ynamics |
| PRCG | P olak- R ibiere C onjugate G radient |
| QTOF | Q uadrupole T ime O f F light |
| RA | R osmarinic A cid |
| RCSB | R esearch C ollaboratory for S tructural B ioinformatics |
| RESP | R estrained E lectro S tatic P otential |
| RMSD | R oot M edian S quare D eviation |
| RMSF | R oot M edian S quare F luctuations |
| ROESY | R otating frame nuclear O verhauser E ffect S pectroscop Y |
| SAX | S trong A nion E xchange |
| SEM | S tandard E rror of the M ean |
| ssNMR | S olid S tate N uclear M agnetic R esonance |
| WAX | W eak A nion E xchange |
| ΕΚΠΑ | Ε θνικό και Κ αποδιστριακό Π ανεπιστήμιο Α θηνών |

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] W.-F. Lai, A.L. Rogach, W.-T. Wong, Chemistry and engineering of cyclodextrins for molecular imaging, *Chemical Society Reviews*, 46 (2017) 6379-6419.
- [2] A. Biber, G. Antranikian, E. Heinzle, Enzymatic production of cyclodextrins, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59 (2002) 609-617.
- [3] W. Saenger, J. Jacob, K. Gessler, T. Steiner, D. Hoffmann, H. Sanbe, K. Koizumi, S.M. Smith, T. Takaha, Structures of the Common Cyclodextrins and Their Larger Analogues Beyond the Doughnut, *Chemical Reviews*, 98 (1998) 1787-1802.
- [4] T. Loftsson, P. Jarho, M. Másson, T. Järvinen, Cyclodextrins in drug delivery, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2 (2005) 335-351.
- [5] J. Zhang, P.X. Ma, Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: recent progress and future perspective, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (2013) 1215-1233.
- [6] K.-H. Frömring, J.Z. Szejtli, Cyclodextrins in pharmacy, In *Topics in inclusion science*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht ; Boston, Chapter 5 (1994) 83-104.
- [7] Y. Kim, D.A. Oksanen, J.W. Masefski, J.F. Blake, E.M. Duffy, B. Chrnyk, Inclusion complexation of ziprasidone mesylate with cyclodextrin sulfobutyl ether, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87 (1998) 1560-1567.
- [8] K. Uekama, M. Otagiri, T. Irie, H. Seo, M. Tsuruoka, Improvement of dissolution and absorption characteristics of phenytoin by a water-soluble β -cyclodextrin-epichlorohydrin polymer, *International Journal of Pharmaceutics*, 23 (1985) 35-42.
- [9] M.E. Davis, M.E. Brewster, Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future, *Nature Reviews Drug Discovery*, 3 (2004) 1023-1035.
- [10] C. Coisne, S. Tilloy, E. Monflier, D. Wils, L. Fenart, F. Gosselet, Cyclodextrins as Emerging Therapeutic Tools in the Treatment of Cholesterol-Associated Vascular and Neurodegenerative Diseases, *Molecules*, 21(12) (2016) 1748.
- [11] B. Gidwani, A. Vyas, A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs, *BioMedical Research International*, 2015 (2015) 198268.
- [12] G. Tiwari, R. Tiwari, A.K. Rai, Cyclodextrins in delivery systems: Applications, *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2 (2010) 72-79.
- [13] J.D. Heidel, T. Schluep, Cyclodextrin-Containing Polymers: Versatile Platforms of Drug Delivery Materials, *Journal of Drug Delivery*, 3 (2012) 262731.
- [14] M.E. Davis, M.E. Brewster, Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future, *Nature Review Drug Discovery*, 3 (2004) 1023-1035.
- [15] C.A. Lipinski, Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44 (2000) 235-249.

- [16] G.L. Amidon, H. Lennernas, V.P. Shah, J.R. Crison, A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability, *Pharmaceutical Research*, 12 (1995) 413-420.
- [17] W.O. Foye, T.L. Lemke, D.A. Williams, Foye's principles of medicinal chemistry, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Chapter 2 (2008) 13-26.
- [18] A.T.M. Serajuddin, Salt formation to improve drug solubility, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59 (2007) 603-616.
- [19] K.T. Savjani, A.K. Gajjar, J.K. Savjani, Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques, *ISRN Pharmaceutics*, 2012 (2012) 10.
- [20] A.R. Mohammed, N. Weston, A.G.A. Coombes, M. Fitzgerald, Y. Perrie, Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability, *International Journal of Pharmaceutics*, 285 (2004) 23-34.
- [21] T. Loftsson, P. Jarho, M. Masson, T. Jarvinen, Cyclodextrins in drug delivery, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2 (2005) 335-351.
- [22] G. Crini, Review: A History of Cyclodextrins, *Chemical Reviews*, 114 (2014) 10940-10975.
- [23] F. Schardinger, Über thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch, *Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel, sowie der Gebrauchsgegenstände*, 6 (1903) 865-880.
- [24] H. Pringsheim, C. Abbe, The chemistry of the monosaccharides and of the polysaccharides, McGraw-Hill Book Company, New York, London, 1932.
- [25] P. Karrer, A.P. Smirnoff, Eine neue Methode zur Gewinnung von Anhydrozuckern, *Helvetica Chimica Acta*, 4 (1921) 817-820.
- [26] K. Freudenberg, G. Blomqvist, L. Ewald, K. Soff, Hydrolyse und Acetolyse der Stärke und der Schardinger-Dextrine, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 69 (1936) 1258-1266.
- [27] K. Freudenberg, M. Meyer-Delius, Über die Schardinger - Dextrine aus Stärke, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 71 (1938) 1596-1600.
- [28] K. Freudenberg, H. Boppel, Methylierte Stärke, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 71 (1938) 2505-2511.
- [29] K. Freudenberg, Diskussionsbemerkung zum Vortrag des Herrn Fr. Schütz, *Angewandte Chemie*, 60 (1948) 125-125.
- [30] D.R. Rhodes, B. Ateeq, Q. Cao, S.A. Tomlins, R. Mehra, B. Laxman, S. Kalyana-Sundaram, R.J. Lonigro, B.E. Helgeson, M.S. Bhojani, A. Rehemtulla, C.G. Kleer, D.F. Hayes, P.C. Lucas, S. Varambally, A.M. Chinnaiyan, AGTR1 overexpression defines a subset of breast cancer and confers sensitivity to losartan, an AGTR1 antagonist, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (2009) 10284-10289.
- [31] D. French, The Schardinger Dextrins, *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 12 (1957) 189-260.

- [32] F. Cramer, H. Hettler, Inclusion compounds of cyclodextrins, *Naturwissenschaften*, 54 (1967) 625-632.
- [33] R.K. McMullan, W. Saenger, J. Fayos, D. Mootz, Topography of cyclodextrin inclusion complexes: Part I. Classification of crystallographic data of α -cyclodextrin inclusion complexes, *Carbohydrate Research*, 31 (1973) 37-46.
- [34] R. Bergeron, R. Rowan, The molecular disposition of sodium p-nitrophenolate in the cavities of cycloheptaamylose and cyclohexaamylose in solution, *Bioorganic Chemistry*, 5 (1976) 425-436.
- [35] D. Prochowicz, A. Kornowicz, J. Lewinski, Interactions of Native Cyclodextrins with Metal Ions and Inorganic Nanoparticles: Fertile Landscape for Chemistry and Materials Science, *Chemical Reviews*, 117 (2017) 13461-13501.
- [36] T.F. Cova, B.F. Milne, A. Pais, Host flexibility and space filling in supramolecular complexation of cyclodextrins: A free-energy-oriented approach, *Carbohydrate Polymers*, 205 (2019) 42-54.
- [37] G. Tegge, Szejtli, J.: *Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes (Cyclodextrine und ihre Einschlußkomplexe)*. Verlag der Ungarischen Akademie der Wissenschaften. Akadémiai Kiadó, Budapest 1982. 296 pages, with numerous tables and formulas, cloth DM 67,50, *Starch - Stärke*, 34 (1982) 395.
- [38] F. Cramer, Cyclodextrin — A Paradigmatic Model, *Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrins: Budapest, Hungary, 30 September–2 October, 1981*, (1982) 3-14.
- [39] M. Kata, B. Selmeczi, Increasing the solubility of drugs through cyclodextrin complexation, *Journal of Inclusion Phenomena*, 5 (1987) 39-43.
- [40] Z.H. Qi, C.T. Sikorski, *Controlled Delivery Using Cyclodextrin Technology, Intelligent Materials for Controlled Release*, 728 (1999) 113-130.
- [41] M.J. Jozwiakowski, K.A. Connors, Aqueous solubility behavior of three cyclodextrins, *Carbohydrate Research*, 143 (1985) 51-59.
- [42] M. Másson, T. Loftsson, E. Stefánsson, How Do Cyclodextrins Enhance Drug Permeability through Biological Membranes?, *Proceedings of the Ninth International Symposium on Cyclodextrins: Santiago de Compostela, Spain, May 31–June 3, 1998*, (1999) 363-366.
- [43] O. Huber, J.z. Szejtli, *Proceedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins, Munich, West Germany, April 20-22, 1988*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands ; Boston, 1988.
- [44] M.A. Swanson, C.F. Cori, Studies on the structure of polysaccharides; acid hydrolysis of starch-like polysaccharides, *The Journal of Biological Chemistry*, 172 (1948) 797-804.
- [45] T. Irie, K. Uekama, Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86 (1997) 147-162.
- [46] T.F. Kellici, G. Liapakis, A.G. Tzakos, T. Mavromoustakos, Pharmaceutical compositions for antihypertensive treatments: a patent review, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 25 (2015) 1305-1317.

- [47] M. Tsuboshima, K. Matsumoto, Y. Arai, H. Wakatsuka, A. Kawasaki, Prostaglandins : Synthetic and Pharmacological Studies and Development, YAKUGAKU ZASSHI, 112 (1992) 447-469.
- [48] K. Inaba, T. Wakuda, K. Uekama, Prostaglandins and their cyclodextrin complexes, Journal of Inclusion Phenomena, 2 (1984) 467-474.
- [49] A. Rajpurkar, C.B. Dhabuwala, Comparison of satisfaction rates and erectile function in patients treated with sildenafil, intracavernous prostaglandin E1 and penile implant surgery for erectile dysfunction in urology practice, The Journal of urology, 170 (2003) 159-163.
- [50] I. Goldstein, D. Udelson, Axial penile rigidity: determinants and relation to hemodynamic parameters, International journal of impotence research, 10 Suppl 2 (1998) S28-33; discussion S49-51.
- [51] P. Brooks, Use and benefits of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, The American Journal of Medicine, 104 (1998) 9S-13S; discussion 21S-22S.
- [52] I. Bjarnason, K. Takeuchi, R. Simpson, NSAIDs: the Emperor's new dogma?, Gut, 52 (2003) 1376-1378.
- [53] J.G. Lombardino, E.H. Wiseman, Piroxicam and other anti-inflammatory oxicams, Medicinal Research Reviews, 2 (1982) 127-152.
- [54] H. Fenner, Pharmacokinetics of piroxicam: new aspects, European Journal Rheumatology Inflammation, 8 (1987) 42-48.
- [55] F. Giordano, R. Bettini, Process for preparation of inclusion compounds between a non-steroidal anti-inflammatory drug and betacyclodextrin by microwave treatment, Google Patents, EP20020805328 on 2002-12-17 (2002) PAT - EP1455838.
- [56] P.P. Chiesi, IT), Pavesi, Luciana (Parma, IT), Pharmaceutical compositions of piroxicam in aqueous solutions and process for their preparation, Chiesi Farmaceutici S.p.A. (Parma, IT), EP19890105004 (1993) EP0336200.
- [57] J. McEwen, Clinical Pharmacology of Piroxicam- β -Cyclodextrin, Clinical Drug Investigation, 19 (2000) 27-31.
- [58] B.G. Woodcock, D. Acerbi, P.G. Merz, S. Rietbrock, N. Rietbrock, Supermolecular inclusion of piroxicam with beta-cyclodextrin: pharmacokinetic properties in man, European Journal Rheumatology Inflammation, 12 (1993) 12-28.
- [59] C.R. Lee, J.A. Balfour, Piroxicam-beta-cyclodextrin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in rheumatic diseases and pain states, Drugs, 48 (1994) 907-929.
- [60] L. Santucci, S. Fiorucci, S. Chiucchiù, A. Sicilia, L. Bufalino, A. Morelli, Placebo-controlled comparison of piroxicam- β -cyclodextrin, piroxicam, and indomethacin on gastric potential difference and mucosal injury in humans, Digestive Diseases and Sciences, 37 (1992) 1825-1832.
- [61] L. Patoia, G. Clausi, F. Farroni, P. Alberti, P. Fugiani, L. Bufalino, Comparison of faecal blood loss, upper gastrointestinal mucosal integrity and symptoms after piroxicam beta-cyclodextrin, piroxicam and placebo administration, European Journal of Clinical Pharmacology, 36 (1989) 599-604.

- [62] P. Buri, A. Gumma, Drug targeting : Proceedings of the Symposium on Drug Targeting, held in Nyon, Switzerland, on 3-5 October 1984, Elsevier Science, Amsterdam ; New York, 1985.
- [63] P.H. Bentley, High Performance Biomaterials. A Comprehensive Guide to Medical and Pharmaceutical Applications, Journal of Royal Society of Medicine, 85 (1992) 775-776.
- [64] G. Tegge, Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes, Starch - Stärke, 34 (1982) 395-395.
- [65] K. Uekama, [Pharmaceutical applications of cyclodextrin complexations (author's transl)], Yakugaku Zasshi, 101 (1981) 857-873.
- [66] K. Uekama, M. Otagiri, Cyclodextrins in drug carrier systems, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 3 (1987) 1-40.
- [67] M.E. Brewster, W.R. Anderson, K.S. Estes, N. Bodor, Development of aqueous parenteral formulations for carbamazepine through the use of modified cyclodextrins, Journal of Pharmaceutical Sciences, 80 (1991) 380-383.
- [68] E. Albers, B.W. Muller, Cyclodextrin derivatives in pharmaceuticals, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 12 (1995) 311-337.
- [69] V.J. Stella, R.A. Rajewski, Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery, Pharmaceutical Research, 14 (1997) 556-567.
- [70] D.O. Thompson, Cyclodextrins--enabling excipients: their present and future use in pharmaceuticals, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 14 (1997) 1-104.
- [71] W. Khuntawee, M. Karttunen, J. Wong-Ekkabut, A molecular dynamics study of conformations of beta-cyclodextrin and its eight derivatives in four different solvents, Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP, 19 (2017) 24219-24229.
- [72] R. Iacovino, J. V. Caso, C. Di Donato, G. Malgieri, M. Palmieri, L. Russo, C. Isernia, Cyclodextrins as Complexing Agents: Preparation and Applications, Current Organic Chemistry, 21 (2017) 162-176.
- [73] T. Loftsson, M.E. Brewster, Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization, Journal of Pharmaceutical Sciences, 85 (1996) 1017-1025.
- [74] R.A. Rajewski, V.J. Stella, Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery, Journal of Pharmaceutical Sciences, 85 (1996) 1142-1169.
- [75] J. Pitha, Amorphous water-soluble derivatives of cyclodextrins: nontoxic dissolution enhancing excipients, Journal of Pharmaceutical Sciences, 74 (1985) 987-990.
- [76] B.W. Müller, U. Brauns, Solubilization of drugs by modified β -cyclodextrins, International Journal of Pharmaceutics, 26 (1985) 77-88.
- [77] K. Uekama, Y. Horiuchi, T. Irie, F. Hirayama, O-carboxymethyl-O-ethylcyclomaltoheptaose as a delayed-release-type drug carrier: improvement of the oral bioavailability of diltiazem in the dog, Carbohydrate Research, 192 (1989) 323-330.

- [78] Y. Horiuchi, F. Hirayama, K. Uekama, [Improvement of stability and bioavailability of 1-hexylcarbonyl-5-fluorouracil (HCFU) by O-carboxymethyl-O-ethyl-beta- cyclodextrin], *Yakugaku Zasshi*, 111 (1991) 592-599.
- [79] Y. Horiuchi, K. Abe, F. Hirayama, K. Uekama, Release control of theophylline by β -cyclodextrin derivatives: hybridizing effect of hydrophilic, hydrophobic and ionizable β -cyclodextrin complexes, *Journal of Controlled Release*, 15 (1991) 177-183.
- [80] F. Hirayama, [Development and pharmaceutical evaluation of hydrophobic cyclodextrin derivatives as modified-release drug carriers], *Yakugaku Zasshi*, 113 (1993) 425-437.
- [81] K. Uekama, N. Hirashima, Y. Horiuchi, F. Hirayama, T. Ijitsu, M. Ueno, Ethylated β -cyclodextrins as hydrophobic drug carriers: Sustained release of diltiazem in the rat, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76 (1987) 660-661.
- [82] J.J. Marshall, I. Miwa, Kinetic difference between hydrolyses of gamma-cyclodextrin by human salivary and pancreatic alpha-amylases, *Biochimica et biophysica acta*, 661 (1981) 142-147.
- [83] F. Hirayama, M. Yamamoto, K. Uekama, Acid-catalyzed hydrolysis of maltosyl- β -cyclodextrin, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81 (1992) 913-916.
- [84] K. Uekama, K. Minami, F. Hirayama, 6A-O-[(4-Biphenyl)acetyl]- α -, β -, and γ -cyclodextrins and 6A-Deoxy-6A-[[4-biphenyl)acetyl]amino]- α -, β -, and γ -cyclodextrins: Potential Prodrugs for Colon-Specific Delivery, *Journal of Medicinal Chemistry*, 40 (1997) 2755-2761.
- [85] F. Hirayama, K. Uekama, Cyclodextrin-based controlled drug release system, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 36 (1999) 125-141.
- [86] T. Tokumura, M. Nanbas, Y. Tsushima, K. Tatsuishi, M. Kayano, Y. Machida, T. Nagai, Enhancement of Bioavailability of Cinnarizine from Its β -Cyclodextrin Complex on Oral Administration with dl-Phenylalanine as a Competing Agent, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75 (1986) 391-394.
- [87] K. Nakanishi, M. Masada, T. Nadai, K. Miyajima, Effect of the interaction of drug-beta-cyclodextrin complex with bile salts on the drug absorption from rat small intestinal lumen, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 37 (1989) 211-214.
- [88] M.T. Esclusa-Diaz, M. Gayo-Otero, M.B. Pérez-Marcos, J.L. Vila-Jato, J.J. Torres-Labandeira, Preparation and evaluation of ketoconazole- β -cyclodextrin multicomponent complexes, *International Journal of Pharmaceutics*, 142 (1996) 183-187.
- [89] M. Pedersen, S. Bjerregaard, J. Jacobsen, A. Rømmelmayer Larsen, A. Mehlsen Sørensen, An econazole β -cyclodextrin inclusion complex: an unusual dissolution rate, supersaturation, and biological efficacy example, *International Journal of Pharmaceutics*, 165 (1998) 57-68.
- [90] K. Uekama, T. Fujinaga, F. Hirayama, M. Otagiri, M. Yamasaki, H. Seo, T. Hashimoto, M. Tsuruoka, Improvement of the oral bioavailability of digitalis glycosides by cyclodextrin complexation, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72 (1983) 1338-1341.

- [91] C.J. Betlach, M.A. Gonzalez, B.C. McKiernan, C. Neff-Davis, N. Bodor, Oral pharmacokinetics of carbamazepine in dogs from commercial tablets and a cyclodextrin complex, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 82 (1993) 1058-1060.
- [92] M. Yamamoto, F. Hirayama, K. Uekama, Improvement of stability and dissolution of prostaglandin E1 by maltosyl-beta-cyclodextrin in lyophilized formulation, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 40 (1992) 747-751.
- [93] T. Jarvinen, K. Jarvinen, N. Schwarting, V.J. Stella, beta-cyclodextrin derivatives, SBE4-beta-CD and HP-beta-CD, increase the oral bioavailability of cinnarizine in beagle dogs, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84 (1995) 295-299.
- [94] F. Hirayama, M. Usami, K. Kimura, K. Uekama, Crystallization and polymorphic transition behavior of chloramphenicol palmitate in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin matrix, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5 (1997) 23-30.
- [95] O.A.E. Soliman, K. Kimura, F. Hirayama, K. Uekama, H.M. El-Sabbagh, A.E.-G.H.A. El-Gawad, F.M. Hashim, Amorphous spironolactone-hydroxypropylated cyclodextrin complexes with superior dissolution and oral bioavailability, *International Journal of Pharmaceutics*, 149 (1997) 73-83.
- [96] J. Pitha, S.M. Harman, M.E. Michel, Hydrophilic cyclodextrin derivatives enable effective oral administration of steroidal hormones, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75 (1986) 165-167.
- [97] J. Pitha, E.J. Anaissie, K. Uekama, gamma-Cyclodextrin:testosterone complex suitable for sublingual administration, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76 (1987) 788-790.
- [98] G.T. Taylor, J. Weiss, J. Pitha, Testosterone in a cyclodextrin-containing formulation: behavioral and physiological effects of episode-like pulses in rats, *Pharmaceutical research*, 6 (1989) 641-646.
- [99] C.A. Stuenkel, R.E. Dudley, S.S. Yen, Sublingual administration of testosterone-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex simulates episodic androgen release in hypogonadal men, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 72 (1991) 1054-1059.
- [100] B. Salehian, C. Wang, G. Alexander, T. Davidson, V. McDonald, N. Berman, R.E. Dudley, F. Ziel, R.S. Swerdloff, Pharmacokinetics, bioefficacy, and safety of sublingual testosterone cyclodextrin in hypogonadal men: comparison to testosterone enanthate--a clinical research center study, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 80 (1995) 3567-3575.
- [101] H. Fridriksdottir, T. Loftsson, J.A. Gudmundsson, G.J. Bjarnason, M. Kjeld, T. Thorsteinsson, Design and in vivo testing of 17 beta-estradiol-HP beta CD sublingual tablets, *Die Pharmazie*, 51 (1996) 39-42.
- [102] H. Seo, K. Uekama, [Enhanced bioavailability of digoxin by gamma-cyclodextrin complexation: evaluation for sublingual and oral administrations in humans], *Yakugaku Zasshi*, 109 (1989) 778-782.
- [103] M. Skiba, C. Morvan, D. Duchene, F. Puisieux, D. Wouessidjewe, Evaluation of gastrointestinal behaviour in the rat of amphiphilic β -cyclodextrin

nanocapsules, loaded with indomethacin, *International Journal of Pharmaceutics*, 126 (1995) 275-279.

[104] K. Uekama, T. Horikawa, Y. Horiuchi, F. Hirayama, In vitro and in vivo evaluation of delayed-release behavior of diltiazem from its O-carboxymethyl-O-ethyl- β -cyclodextrin complex, *Journal of Controlled Release*, 25 (1993) 99-106.

[105] T. Horikawa, F. Hirayama, K. Uekama, In-vivo and In-vitro Correlation for Delayed-release Behaviour of a Molsidomine/O-carboxymethyl-O-ethyl- β -cyclodextrin Complex in Gastric Acidity-controlled Dogs, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 47 (1995) 124-127.

[106] Y. Horiuchi, F. Hirayama, K. Uekama, Slow-release characteristics of diltiazem from ethylated beta-cyclodextrin complexes, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79 (1990) 128-132.

[107] F. Hirayama, N. Hirashima, K. Abe, K. Uekama, T. Ijitsu, M. Ueno, Utilization of diethyl-beta-cyclodextrin as a sustained-release carrier for isosorbide dinitrate, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77 (1988) 233-236.

[108] K. Nakanishi, T. Masukawa, T. Nadai, K. Yoshii, S. Okada, K. Miyajima, Sustained release of flufenamic acid from a drug-triacetyl-beta-cyclodextrin complex, *Biological & pharmaceutical bulletin*, 20 (1997) 66-70.

[109] M. Yamada, F. Hirayama, K. Uekama, Release-control of a water-soluble drug by film-forming., *Drug Delivery System*, 14 (1999) 27-32.

[110] K. Uekama, T. Horikawa, M. Yamanaka, F. Hirayama, Peracylated beta-cyclodextrins as novel sustained-release carriers for a water-soluble drug, molsidomine, *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 46 (1994) 714-717.

[111] F. Hirayama, T. Horikawa, M. Yamanaka, K. Uekama, Enhanced Bioavailability and Reduced Metabolism of Salbutamol by Perbutanoyl- β -cyclodextrin after Oral Administration in Dogs, *Pharmacy and Pharmacology Communications*, 1 (1995) 517-520.

[112] K. Uekama, K. Ikegami, Z. Wang, Y. Horiuchi, F. Hirayama, Inhibitory effect of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on crystal-growth of nifedipine during storage: superior dissolution and oral bioavailability compared with polyvinylpyrrolidone K-30, *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 44 (1992) 73-78.

[113] Z. Wang, F. Hirayama, K. Ikegami, K. Uekama, Release Characteristics of Nifedipine from 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin Complex during Storage and Its Modification of Hybridizing Polyvinylpyrrolidone K-30, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 41 (1993) 1822-1826.

[114] Z. Wang, T. Horikawa, F. Hirayama, K. Uekama, Design and in-vitro evaluation of a modified-release oral dosage form of nifedipine by hybridization of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and hydroxypropylcellulose, *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 45 (1993) 942-946.

[115] Z. Wang, F. Hirayama, K. Uekama, In-vivo and in-vitro evaluations of a modified-release oral dosage form of nifedipine by hybridization of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and hydroxypropylcelluloses in dogs, *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46 (1994) 505-507.

- [116] K. Uekama, K. Matsubara, K. Abe, Y. Horiuchi, F. Hirayama, N. Suzuki, Design and in vitro evaluation of slow-release dosage form of piretanide: utility of beta-cyclodextrin:cellulose derivative combination as a modified-release drug carrier, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79 (1990) 244-248.
- [117] G.M. Zentner, G.S. Rork, K.J. Himmelstein, Osmotic flow through controlled porosity films: An approach to delivery of water soluble compounds, *Journal of Controlled Release*, 2 (1985) 217-229.
- [118] K. Okimoto, M. Miyake, N. Ohnishi, R. Rajewski, V. J. Stella, T. Irie, K. Uekama, Design and Evaluation of an Osmotic Pump Tablet (OPT) for Prednisolone, a Poorly Water Soluble Drug, Using (SBE)7m- β -CD, *Pharmaceutical Research*, 15 (1998) 1562-1568.
- [119] K. Okimoto, R.A. Rajewski, K. Uekama, J.A. Jona, V.J. Stella, The interaction of charged and uncharged drugs with neutral (HP-beta-CD) and anionically charged (SBE7-beta-CD) beta-cyclodextrins, *Pharmaceutical Research*, 13 (1996) 256-264.
- [120] K. Okimoto, M. Miyake, O. Aoki, N. Ohnishi, T. Irie, K. Uekama, R.A. Rajewski, V.J. Stella, Design and Evaluation of a Porosity-Controlled Osmotic Pump Tablet for Chlorpromazine Using (Sbe)7m- β -CD, *Proceedings of the Ninth International Symposium on Cyclodextrins: Santiago de Compostela, Spain, May 31–June 3, 1998*, (1999) 285-288.
- [121] M. Malanga, J. Szeman, E. Fenyvesi, I. Puskas, K. Csabai, G. Gyemant, F. Fenyvesi, L. Szente, "Back to the Future": A New Look at Hydroxypropyl Beta-Cyclodextrins, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105 (2016) 2921-2931.
- [122] T.O. Carpenter, J.M. Pettifor, R.M. Russell, J. Pitha, S. Mobarhan, M.S. Ossip, S. Wainer, C.S. Anast, Severe hypervitaminosis A in siblings: evidence of variable tolerance to retinol intake, *The Journal of Pediatrics*, 111 (1987) 507-512.
- [123] J. Peeters, P. Neeskens, J.P. Tollenaere, P. Van Remoortere, M.E. Brewster, Characterization of the interaction of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin with itraconazole at pH 2, 4, and 7, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91 (2002) 1414-1422.
- [124] K. De Beule, Itraconazole: pharmacology, clinical experience and future development, *International journal of antimicrobial agents*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6 (1996) 175-181.
- [125] R. Negroni, A.I. Arechavala, Itraconazole: pharmacokinetics and indications, *Archives of Medical Research*, 24 (1993) 387-393.
- [126] G.E. Piérard, J.E. Arrese, C. Piérard-Franchimont, Itraconazole, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 1 (2000) 287-304.
- [127] S. Jain, V.N. Sehgal, Itraconazole: an effective oral antifungal for onychomycosis, *International Journal of Dermatology*, 40 (2001) 1-5.
- [128] G. Verreck, I. Chun, J. Peeters, J. Rosenblatt, M.E. Brewster, Preparation and Characterization of Nanofibers Containing Amorphous Drug Dispersions Generated by Electrostatic Spinning, *Pharmaceutical research*, 20 (2003) 810-817.

- [129] S. Jaruratanasirikul, A. Kleepkaew, Influence of an acidic beverage (Coca-Cola) on the absorption of itraconazole, *European Journal of Clinical Pharmacology*, 52 (1997) 235-237.
- [130] L.S. Welage, P.L. Carver, S. Revankar, C. Pierson, C.A. Kauffman, Alterations in gastric acidity in patients infected with human immunodeficiency virus, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 21 (1995) 1431-1438.
- [131] D. Slain, P.D. Rogers, J.D. Cleary, S.W. Chapman, Intravenous itraconazole, *The Annals of Pharmacotherapy*, 35 (2001) 720-729.
- [132] L. Willems, R. van der Geest, K. de Beule, Itraconazole oral solution and intravenous formulations: a review of pharmacokinetics and pharmacodynamics, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 26 (2001) 159-169.
- [133] M.E. Brewster, G. Verreck, I. Chun, J. Rosenblatt, J. Mensch, A. Van Dijck, M. Noppe, A. Arien, M. Bruining, J. Peeters, The use of polymer-based electrospun nanofibers containing amorphous drug dispersions for the delivery of poorly water-soluble pharmaceuticals, *Die Pharmazie*, 59 (2004) 387-391.
- [134] S. Gould, R.C. Scott, 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review, *Food and Chemical Toxicology*, 43 (2005) 1451-1459.
- [135] F.L. Matassoli, I.C. Leao, B.B. Bezerra, R.B. Pollard, D. Lutjohann, J.E.K. Hildreth, L.B. Arruda, Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin Reduces Inflammatory Signaling from Monocytes: Possible Implications for Suppression of HIV Chronic Immune Activation, *mSphere*, 3 (2018) e00497-00418.
- [136] E. Berry-Kravis, J. Chin, A. Hoffmann, A. Winston, R. Stoner, L. LaGorio, K. Friedmann, M. Hernandez, D.S. Ory, F.D. Porter, J.A. O'Keefe, Long-Term Treatment of Niemann-Pick Type C1 Disease With Intrathecal 2-Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin, *Pediatric Neurology*, 80 (2018) 24-34.
- [137] M. Maulik, B. Ghoshal, J. Kim, Y. Wang, J. Yang, D. Westaway, S. Kar, Mutant human APP exacerbates pathology in a mouse model of NPC and its reversal by a beta-cyclodextrin, *Human Molecular Genetics*, 21 (2012) 4857-4875.
- [138] D.R.M. Graham, E. Chertova, J.M. Hilburn, L.O. Arthur, J.E.K. Hildreth, Cholesterol depletion of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus with beta-cyclodextrin inactivates and permeabilizes the virions: evidence for virion-associated lipid rafts, *Journal of Virology*, 77 (2003) 8237-8248.
- [139] S. Barman, D.P. Nayak, Lipid raft disruption by cholesterol depletion enhances influenza A virus budding from MDCK cells, *Journal of Virology*, 81 (2007) 12169-12178.
- [140] G. Senti, R. Iannaccone, N. Graf, M. Felder, F. Tay, T. Kundig, A randomized, double-blind, placebo-controlled study to test the efficacy of topical 2-hydroxypropyl-Beta-cyclodextrin in the prophylaxis of recurrent herpes labialis, *Dermatology (Basel, Switzerland)*, 226 (2013) 247-252.
- [141] A.A. Wolf, Y. Fujinaga, W.I. Lencer, Uncoupling of the cholera toxin-G(M1) ganglioside receptor complex from endocytosis, retrograde Golgi trafficking, and

downstream signal transduction by depletion of membrane cholesterol, *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (2002) 16249-16256.

[142] M. Yokoo, Y. Kubota, K. Motoyama, T. Higashi, M. Taniyoshi, H. Tokumaru, R. Nishiyama, Y. Tabe, S. Mochinaga, A. Sato, N. Sueoka-Aragane, E. Sueoka, H. Arima, T. Irie, S. Kimura, 2-Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin Acts as a Novel Anticancer Agent, *PloS one*, 10 (2015) e0141946.

[143] S.S. Bakke, M.H. Aune, N. Niyonzima, K. Pilely, L. Ryan, M. Skjelland, P. Garred, P. Aukrust, B. Halvorsen, E. Latz, J.K. Damas, T.E. Mollnes, T. Espevik, Cyclodextrin Reduces Cholesterol Crystal-Induced Inflammation by Modulating Complement Activation, *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 199 (2017) 2910-2920.

[144] C. Celia, A. Scala, R. Stancanelli, E. Surdo, D. Paolino, A. Grattoni, N. Micale, V. Crupi, D. Majolino, M. Fresta, S. Tommasini, V. Venuti, C.A. Ventura, Physicochemical properties of inclusion complexes of highly soluble beta-cyclodextrins with highly hydrophobic testosterone propionate, *International Journal of Pharmaceutics*, 534 (2017) 316-324.

[145] R. Agabio, F. Sanna, C. Lobina, M. Monduzzi, V. Nairi, F. Cugia, S. Mameli, G.M. Pisanu, G.L. Gessa, M.R. Melis, Is 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin a Suitable Carrier for Central Administration of Delta(9) - Tetrahydrocannabinol? Preclinical Evidence, *Drug Development Research*, 78 (2017) 411-419.

[146] G. Buckton, A.E. Beezer, The applications of microcalorimetry in the field of physical pharmacy, *International Journal of Pharmaceutics*, 72 (1991) 181-191.

[147] Μ.Δ. Ροβολή, Μελέτη σύνδεσης και βιοδραστικότητας βιταμινών μετά από τη σύνδεσή τους με πρωτεϊνικά και λιπιδικά μόρια, *Διδακτορική Διατριβή, Κεφάλαιο 2* (2015) 111-113.

[148] H.-J. Schneider, F. Hacket, V. Rüdiger, H. Ikeda, NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes, *Chemical Reviews*, 98 (1998) 1755-1786.

[149] D. Ntountaniotis, Διαμορφωτική μελέτη αντιυπερτασικών φαρμάκων και αλληλεπιδράσεις τους με λιποειδείς διπλοστιβάδες με χρήση φυσικοχημικών μεθόδων, *Διδακτορική Διατριβή, Κεφάλαιο 7* (2012) 95-120.

[150] B.S. Temirgazyev, K. Kucakova, Y.A. Baizhigit, M. Jurasek, P. Dzubak, M. Hajdich, B. Dolensky, P.B. Drasar, B.I. Tuleuov, S.M. Adekenov, Bioavailability and structural study of 20-hydroxyecdysone complexes with cyclodextrins, *Steroids*, 147 (2018) 37-41.

[151] Z. Hadian, M. Maleki, K. Abdi, F. Atyabi, A. Mohammadi, R. Khaksar, Preparation and Characterization of Nanoparticle beta-Cyclodextrin:Geraniol Inclusion Complexes, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 17 (2018) 39-51.

[152] A.I. Ramos, P.D. Vaz, S.S. Braga, A.M.S. Silva, Association of aescin with beta- and gamma-cyclodextrins studied by DFT calculations and spectroscopic methods, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 8 (2017) 348-357.

- [153] J.S. Waugh, Nuclear dipole-dipole interactions, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 70 (1958) 900-926.
- [154] D.E. Bugay, Solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy: theory and pharmaceutical applications, *Pharmaceutical Research*, 10 (1993) 317-327.
- [155] E.R. Andrew, G.J. Jenks, The Narrowing of Nuclear Magnetic Resonance Spectra by Molecular Rotation in Solids: II. Further Calculations for a System of Reorienting Nuclear Pairs, *Proceedings of the Physical Society*, 80 (1962) 663.
- [156] E.R. Andrew, A. Bradbury, R.G. Eades, Removal of Dipolar Broadening of Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Solids by Specimen Rotation, *Nature*, 183 (1959) 1802.
- [157] A. Pines, M.G. Gibby, J.S. Waugh, Proton-enhanced NMR of dilute spins in solids, *The Journal of Chemical Physics*, 59 (1973) 569-590.
- [158] Θ. Μαυρομούστακος, Ι. Νταλιάνη, Π. Ζουμπουλάκης, Α. Κολοκούρης, Ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός σε Στερεή Κατάσταση. Ένα ανεκτίμητο εργαλείο στη Φαρμακευτική Χημεία, *Φαρμακευτική*, 13 (2000) 37-51.
- [159] M. Karplus, Molecular dynamics: applications to proteins, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 482 (1986) 255-266.
- [160] D.C. Young, Computational chemistry : a practical guide for applying techniques to real world problems, Wiley, New York, Chapter 7 (2001) 60-62.
- [161] D.A. Case, T.E. Cheatham, 3rd, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K.M. Merz, Jr., A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang, R.J. Woods, The Amber biomolecular simulation programs, *Journal of Computational Chemistry*, 26 (2005) 1668-1688.
- [162] B.R. Brooks, C.L. Brooks, 3rd, A.D. Mackerell, Jr., L. Nilsson, R.J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch, A. Caffisch, L. Caves, Q. Cui, A.R. Dinner, M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoscek, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. Ma, V. Ovchinnikov, E. Paci, R.W. Pastor, C.B. Post, J.Z. Pu, M. Schaefer, B. Tidor, R.M. Venable, H.L. Woodcock, X. Wu, W. Yang, D.M. York, M. Karplus, CHARMM: the biomolecular simulation program, *Journal of Computational Chemistry*, 30 (2009) 1545-1614.
- [163] W.L. Jorgensen, D.S. Maxwell, J. Tirado-Rives, Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids, *Journal of the American Chemical Society*, 118 (1996) 11225-11236.
- [164] Χ. Τζούπης, Σχεδιασμός καινοτόμων αναστολέων της ρενίνης και της HIV-1 πρωτεάσης., *Διδακτορική Διατριβή*, Κεφάλαιο 2 (2014) 46-50.
- [165] T.F. Kellici, Δυναμικές ιδιότητες της ολμεσαρτάνης στο διάλυμα και στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα τύπου 1 της αγγειοτασίνης II. Βελτιστοποίηση φαρμακευτικού προφίλ βιοδραστικών ενώσεων μέσω συμπλόκων εγκλεισμού., *Διδακτορική Διατριβή*, Κεφάλαιο 1 (2017) 45-46.
- [166] C. Wang, D. Greene, L. Xiao, R. Qi, R. Luo, Recent Developments and Applications of the MMPBSA Method, *Frontiers in Molecular Biosciences*, 4 (2017) 87.
- [167] E. Alvarez-Parrilla, L.A.D.L. Rosa, F. Torres-Rivas, J. Rodrigo-Garcia, G.A. González-Aguilar, Complexation of Apple Antioxidants: Chlorogenic Acid,

Quercetin and Rutin by β -Cyclodextrin (β -CD), *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 53 (2005) 121-129.

[168] Γ. Θεοδωρίδης, Σ. Γηρούση, Γ. Ζαχαριάδης, Α.Σ. Ζώτου, Β. Σαμανίδου, Φασματομετρία μάζας, Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, Αθήνα, Κεφάλαιο 12 (2015) 18-20.

[169] S.H. Lomeli, S. Yin, R.R. Ogorzalek Loo, J.A. Loo, Increasing Charge While Preserving Noncovalent Protein Complexes for ESI-MS, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20 (2009) 593-596.

[170] D. Diamantis, Τροποποίηση φυσικών προϊόντων στοχεύοντας την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητάς τους., Διδακτορική Διατριβή, Κεφάλαιο 1 (2017) 17-18.

[171] J.V. Formica, W. Regelson, Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids, *Food and Chemical Toxicology*, 33 (1995) 1061-1080.

[172] D.P. Makris, J.T. Rossiter, Heat-Induced, Metal-Catalyzed Oxidative Degradation of Quercetin and Rutin (Quercetin 3-O-Rhamnosylglucoside) in Aqueous Model Systems, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (2000) 3830-3838.

[173] C. Manach, C. Morand, C. Demigné, O. Texier, F. Régéat, C. Rémésy, Bioavailability of rutin and quercetin in rats, *FEBS letters*, 409 (1997) 12-16.

[174] C. Manach, C. Morand, V. Crespy, C. Demigne, O. Texier, F. Regeat, C. Remesy, Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties, *FEBS letters*, 426 (1998) 331-336.

[175] R. Gugler, M. Leschik, H.J. Dengler, Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses, *The European Journal of Clinical Pharmacology*, 9 (1975) 229-234.

[176] V. Exarchou, A. Troganis, I.P. Gerothanassis, M. Tsimidou, D. Boskou, Identification and quantification of caffeic and rosmarinic acid in complex plant extracts by the use of variable-temperature two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2001) 2-8.

[177] İ. Gülçin, Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid), *Toxicology*, 217 (2006) 213-220.

[178] T.C. Genaro-Mattos, A.Q. Mauricio, D. Rettori, A. Alonso, M. Hermes-Lima, Antioxidant Activity of Caffeic Acid against Iron-Induced Free Radical Generation--A Chemical Approach, *PloS one*, 10 (2015) e0129963.

[179] O. Fadel, K. El Kirat, S. Morandat, The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1808 (2011) 2973-2980.

[180] F. Zhu, T. Asada, A. Sato, Y. Koi, H. Nishiwaki, H. Tamura, Rosmarinic Acid Extract for Antioxidant, Antiallergic, and α -Glucosidase Inhibitory Activities, Isolated by Supramolecular Technique and Solvent Extraction from Perilla Leaves, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (2014) 885-892.

[181] C.Y. Chao, M.C. Mong, K.C. Chan, M.C. Yin, Anti-glycative and anti-inflammatory effects of caffeic acid and ellagic acid in kidney of diabetic mice, *Molecular Nutrition & Food Research*, 54 (2010) 388-395.

- [182] M.A. Berhow, A.O. Affum, B.A. Gyan, Rosmarinic acid content in antidiabetic aqueous extract of *Ocimum canum sims* grown in Ghana, *Journal of Medicinal Food*, 15 (2012) 611-620.
- [183] R. Vinayagam, M. Jayachandran, B. Xu, Antidiabetic Effects of Simple Phenolic Acids: A Comprehensive Review, *Phytotherapy Research : PTR*, 30 (2016) 184-199.
- [184] Y. Li, L.J. Chen, F. Jiang, Y. Yang, X.X. Wang, Z. Zhang, Z. Li, L. Li, Caffeic acid improves cell viability and protects against DNA damage: involvement of reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48 (2015) 502-508.
- [185] J.H. Chen, C.-T. Ho, Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (1997) 2374-2378.
- [186] N. Rajendra Prasad, A. Karthikeyan, S. Karthikeyan, B.V. Reddy, Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 349 (2011) 11-19.
- [187] H. Ghaffari, M. Venkataramana, B. Jalali Ghassam, S. Chandra Nayaka, A. Nataraju, N.P. Geetha, H.S. Prakash, Rosmarinic acid mediated neuroprotective effects against H₂O₂-induced neuronal cell damage in N2A cells, *Life Sciences*, 113 (2014) 7-13.
- [188] J. Rocha, M. Eduardo-Figueira, A. Barateiro, A. Fernandes, D. Brites, R. Bronze, C.M. Duarte, A.T. Serra, R. Pinto, M. Freitas, E. Fernandes, B. Silva-Lima, H. Mota-Filipe, B. Sepodes, Anti-inflammatory effect of rosmarinic acid and an extract of *Rosmarinus officinalis* in rat models of local and systemic inflammation, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 116 (2015) 398-413.
- [189] M.A. Furtado, L.C. de Almeida, R.A. Furtado, W.R. Cunha, D.C. Tavares, Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay, *Mutation Research*, 657 (2008) 150-154.
- [190] S.P. Ekambaram, S.S. Perumal, A. Balakrishnan, N. Marappan, S.S. Gajendran, V. Viswanathan, Antibacterial synergy between rosmarinic acid and antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 5 (2016) 358-363.
- [191] V. Swarup, J. Ghosh, S. Ghosh, A. Saxena, A. Basu, Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (2007) 3367-3370.
- [192] H.J. Lee, Y.I. Jeong, T.H. Lee, I.D. Jung, J.S. Lee, C.M. Lee, J.I. Kim, H. Joo, J.D. Lee, Y.M. Park, Rosmarinic acid inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in murine dendritic cells, *Biochemical Pharmacology*, 73 (2007) 1412-1421.
- [193] M. Zhang, J. Li, L. Zhang, J. Chao, Preparation and spectral investigation of inclusion complex of caffeic acid with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin, *Spectrochim Acta A Molecular Biomolecular Spectroscopy*, 71 (2009) 1891-1895.

- [194] A. Aksamija, A. Polidori, R. Plasson, O. Dangles, V. Tomao, The inclusion complex of rosmarinic acid into beta-cyclodextrin: A thermodynamic and structural analysis by NMR and capillary electrophoresis, *Food Chemistry*, 208 (2016) 258-263.
- [195] M. Tamargo, J. Tamargo, Future drug discovery in renin-angiotensin-aldosterone system intervention, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12 (2017) 827-848.
- [196] T.F. Kellici, G. Liapakis, A.G. Tzakos, T. Mavromoustakos, Pharmaceutical compositions for antihypertensive treatments: a patent review, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 25 (2015) 1305-1317.
- [197] D. Ntountaniotis, G. Mali, S.G. Grdadolnik, M. Halabalaki, A.L. Skaltsounis, C. Potamitis, E. Siapi, P. Chatzigeorgiou, M. Rappolt, T. Mavromoustakos, Thermal, dynamic and structural properties of drug AT1 antagonist olmesartan in lipid bilayers, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808 (2011) 2995-3006.
- [198] R.A. Friesner, R.B. Murphy, M.P. Repasky, L.L. Frye, J.R. Greenwood, T.A. Halgren, P.C. Sanschagrín, D.T. Mainz, Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes, *Journal of Medicinal Chemistry*, 49 (2006) 6177-6196.
- [199] R. Salomon-Ferrer, D.A. Case, R.C. Walker, An overview of the Amber biomolecular simulation package, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 3 (2013) 198-210.
- [200] D.R. Roe, T.E. Cheatham, PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 9 (2013) 3084-3095.
- [201] V. Theodorou, K. Skobridis, A.G. Tzakos, V. Ragoussis, A simple method for the alkaline hydrolysis of esters, *Tetrahedron Letters*, 48 (2007) 8230-8233.
- [202] T.A. Halgren, R.B. Murphy, R.A. Friesner, H.S. Beard, L.L. Frye, W.T. Pollard, J.L. Banks, Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening, *Journal of Medicinal Chemistry*, 47 (2004) 1750-1759.
- [203] D. Shivakumar, J. Williams, Y. Wu, W. Damm, J. Shelley, W. Sherman, Prediction of Absolute Solvation Free Energies using Molecular Dynamics Free Energy Perturbation and the OPLS Force Field, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 6 (2010) 1509-1519.
- [204] T.F. Kellici, D. Ntountaniotis, G. Leonis, M. Chatziathanasiadou, A.V. Chatzikonstantinou, J. Becker-Baldus, C. Glaubitz, A.G. Tzakos, K. Viras, P. Chatzigeorgiou, S. Tzimas, E. Kefala, G. Valsami, H. Archontaki, M.G. Papadopoulos, T. Mavromoustakos, Investigation of the interactions of silibinin with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin through biophysical techniques and computational methods, *Molecular Pharmaceutics*, 12 (2015) 954-965.
- [205] T.F. Kellici, M.V. Chatziathanasiadou, D. Diamantis, A.V. Chatzikonstantinou, I. Andreadelis, E. Christodoulou, G. Valsami, T. Mavromoustakos, A.G. Tzakos, Mapping the interactions and bioactivity of quercetin-(2-hydroxypropyl)-beta-cyclodextrin complex, *International Journal of Pharmaceutics*, 511 (2016) 303-311.

[206] Y. Cheng, W.H. Prusoff, Relationship between the inhibition constant (K_1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction, *Biochemical Pharmacology*, 22 (1973) 3099-3108.

[207] A.K. Chattah, K.H. Mroue, L.Y. Pfund, A. Ramamoorthy, M.R. Longhi, C. Garner, insights into novel supramolecular complexes of two solid forms of norfloxacin and beta-cyclodextrin, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102 (2013) 3717-3724.

[208] M. Ekor, The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety, *Frontiers in Pharmacology*, 4 (2013) 177.

[209] Y. Zhang, L. He, S. Yue, Q. Huang, J. Yang, Characterization and evaluation of a self-microemulsifying drug delivery system containing tectorigenin, an isoflavone with low aqueous solubility and poor permeability, *Drug Delivery*, 24 (2017) 632-640.

[210] Z. Qiang, Z. Ye, C. Hauck, P.A. Murphy, J.A. McCoy, M.P. Widrlechner, M.B. Reddy, S. Hendrich, Permeability of rosmarinic acid in *Prunella vulgaris* and ursolic acid in *Salvia officinalis* extracts across Caco-2 cell monolayers, *Journal of Ethnopharmacology*, 137 (2011) 1107-1112.

[211] S.J. Wang, J. Zeng, B.K. Yang, Y.M. Zhong, Bioavailability of caffeic acid in rats and its absorption properties in the Caco-2 cell model, *Pharmaceutical Biology*, 52 (2014) 1150-1157.

[212] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, *Scientific Reports*, 7 (2017) 42717.

[213] J.B. Baell, G.A. Holloway, New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays, *Journal of Medicinal Chemistry*, 53 (2010) 2719-2740.

[214] A.S. Liossi, D. Ntountaniotis, T.F. Kellici, M.V. Chatziathanasiadou, G. Megariotis, M. Mania, J. Becker-Baldus, M. Kriechbaum, A. Krajnc, E. Christodoulou, C. Glaubitz, M. Rappolt, H. Amenitsch, G. Mali, D.N. Theodorou, G. Valsami, M. Pitsikalis, H. Iatrou, A.G. Tzakos, T. Mavromoustakos, Exploring the interactions of irbesartan and irbesartan-2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complex with model membranes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1859 (2017) 1089-1098.

[215] Ł. Szeleszczuk, M. Pisklak, M. Zielińska-Pisklak, I. Wawer, Effects of structural differences on the NMR chemical shifts in cinnamic acid derivatives: Comparison of GIAO and GIPAW calculations, *Chemical Physics Letters*, 653 (2016) 35-41.

[216] Y. Lu, L. Yeap Foo, Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace, *Food Chemistry*, 68 (2000) 81-85.

[217] T. Fukami, T. Ishii, T. Ito, N. Suzuki, T. Suzuki, K. Yamamoto, J. Xu, A. Ramamoorthy, K. Tomono, Nanoparticle processing in the solid state dramatically increases the cell membrane permeation of a cholesterol-lowering drug, probucol, *Molecular Pharmaceutics*, 6 (2009) 1029-1035.

- [218] S.K. Upadhyay, G. Kumar, NMR and molecular modelling studies on the interaction of fluconazole with beta-cyclodextrin, *Chemistry Central journal*, 10 (2009) 9.
- [219] B. Medronho, A. J. M. Valente, P. Costa, A. Romano, Inclusion complexes of rosmarinic acid and cyclodextrins: stoichiometry, association constants, and antioxidant potential, *Colloid and Polymer Science*, 292 (2013) 885-894.
- [220] X.-J. Zhou, L.-L. Yan, P.-P. Yin, L.-L. Shi, J.-H. Zhang, Y.-J. Liu, C. Ma, Structural characterisation and antioxidant activity evaluation of phenolic compounds from cold-pressed *Perilla frutescens* var. *arguta* seed flour, *Food Chemistry*, 164 (2014) 150-157.
- [221] M. Mitra, S.-A. Mohammadreza, A. Ghannadi, N. Ghassemi Dehkordi, S.E. Sajjadi, Production of Rosmarinic Acid in *Echium amoenum* Fisch. and C.A. Mey. Cell Cultures, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 4(2005) 1-5.
- [222] R. Zhao, C. Sandstrom, H. Zhang, T. Tan, NMR Study on the Inclusion Complexes of beta-Cyclodextrin with Isoflavones, *Molecules*, 21 (2016) 372.
- [223] C. Pigliacelli, P. Belton, P. Wilde, S. Qi, Probing the molecular interactions between pharmaceutical polymeric carriers and bile salts in simulated gastrointestinal fluids using NMR spectroscopy, *Journal of Colloid and Interface Science*, 551 (2019) 147-154.
- [224] Y. Wei, J. Zhang, Y. Zhou, W. Bei, Y. Li, Q. Yuan, H. Liang, Characterization of glabridin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex with robust solubility and enhanced bioactivity, *Carbohydrate Polymers*, 159 (2017) 152-160.
- [225] Y. Zheng, L.N. Dong, M. Liu, A. Chen, S. Feng, B. Wang, D. Sun, Effect of pH on the complexation of kaempferol-4'-glucoside with three beta-cyclodextrin derivatives: isothermal titration calorimetry and spectroscopy study, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (2014) 244-250.
- [226] M. Wszelaka-Rylik, P. Gierycz, Isothermal titration calorimetry (ITC) study of natural cyclodextrins inclusion complexes with tropane alkaloids, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 121 (2015) 1359-1364.
- [227] S.E. Çelik, M. Özyürek, A.N. Tufan, K. Güçlü, R. Apak, Spectroscopic study and antioxidant properties of the inclusion complexes of rosmarinic acid with natural and derivative cyclodextrins, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78 (2011) 1615-1624.
- [228] A.T. Fenley, N.M. Henriksen, H.S. Muddana, M.K. Gilson, Bridging Calorimetry and Simulation through Precise Calculations of Cucurbituril-Guest Binding Enthalpies, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 10 (2014) 4069-4078.
- [229] D.G. Waller, C.F. George, Prodrugs, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 28 (1989) 497-507.
- [230] Z. Khawaja, C.S. Wilcox, An overview of candesartan in clinical practice, *Expert Reviews on Cardiovascular Therapy*, 9 (2011) 975-982.
- [231] D. Ntountaniotis, I. Andreadelis, T.F. Kellici, V. Karageorgos, G. Leonis, E. Christodoulou, S. Kiriakidi, J. Becker-Baldus, E.K. Stylos, M.V.

Chatziathanasiadou, C.M. Chatzigiannis, D.E. Damalas, B. Aksoydan, U. Javornik, G. Valsami, C. Glaubitz, S. Durdagi, N.S. Thomaidis, A. Kolocouris, J. Plavec, A.G. Tzakos, G. Liapakis, T. Mavromoustakos, Host-guest interactions between candesartan and its prodrug candesartan cilexetil in complex with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: on the biological potency for Angiotensin II antagonism, *Molecular Pharmaceutics*, 16 (2019) 1255-1271.

[232] D. Ntountaniotis, T. Kellici, A. Tzakos, P. Kolokotroni, T. Tselios, J. Becker-Baldus, C. Glaubitz, S. Lin, A. Makriyannis, T. Mavromoustakos, The application of solid-state NMR spectroscopy to study candesartan cilexetil (TCV-116) membrane interactions. Comparative study with the AT1R antagonist drug olmesartan, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1838 (2014) 2439-2450.

[233] M. Oana, A. Tintaru, D. Gavriuiu, O. Maior, M. Hillebrand, Spectral Study and Molecular Modeling of the Inclusion Complexes of β -Cyclodextrin with Some Phenoxathiin Derivatives, *The Journal of Physical Chemistry B*, 106 (2002) 257-263.

[234] M.T. Mercader-Ros, C. Lucas-Abellan, J.A. Gabaldon, M.I. Fortea, A. Martinez-Cacha, E. Nunez-Delicado, Kaempferol complexation in cyclodextrins at basic pH, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (2010) 4675-4680.

[235] A.C. Illapakurthy, C.M. Wyandt, S.P. Stodghill, Isothermal titration calorimetry method for determination of cyclodextrin complexation thermodynamics between artemisinin and naproxen under varying environmental conditions, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 59 (2005) 325-332.

[236] A.A. Al Omari, M.M. Al Omari, A.A. Badwan, K.A. Al-Sou'od, Effect of cyclodextrins on the solubility and stability of candesartan cilexetil in solution and solid state, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54 (2011) 503-509.