



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ Ι: ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Νανοσυστήματα με εγκλεισμένες κινολινόνες και μελέτη  
της ικανότητάς τους να αλληλεπιδρούν με το DNA**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΙΣΕΡΛΗ ΜΑΡΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΔΕΤΣΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ 2021

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου κατά το ακαδημαϊκό έτος 2020 – 2021, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Ε.Μ.Π. Δρ. Αναστασίας Δέτση.

Πρωτίστως, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην κα Δέτση που μου εμπιστεύτηκε το συγκεκριμένο θέμα διπλωματικής εργασίας και μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με κάτι τόσο ενδιαφέρον, αποκομίζοντας πληθώρα γνώσεων.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στις Καθηγήτριες Ε.Μ.Π Σταματίνα Βουγιούκα και Κωνσταντίνα Τζιά για την συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή, καθώς και για τον χρόνο που διέθεσαν για την κριτική ανάγνωση της εργασίας μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτορα Μπαϊρακτάρη Μαρία, η οποία έπαιξε καίριο ρόλο στην προσπάθειά μου και γεμάτη αισιοδοξία με καθοδήγησε σε κάθε μου βήμα. Την ευχαριστώ για την πολύτιμη βοήθεια της και την γνώση που μου μετέδωσε, καθώς και για την άψογη συνεργασία μας αυτούς τους μήνες.

Ακόμα, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην υποψήφια διδάκτορα της σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π Ιωάννα Πιττερού για την προθυμία της να με βοηθήσει σε οποιαδήποτε δυσκολία αντιμετώπιζα και την συνεχή στήριξή της, ενώ επίσης ευχαριστώ την υποψήφια διδάκτορα Καβέτσου Ελένη και την κα Ζαμπία Κατσανεβάκη, μέλος του Εργαστηριακού Προσωπικού, για την βοήθεια τους κατά την εκπόνηση της εργασίας μου. Ευχαριστώ, επίσης, ολόκληρη την ομάδα του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα.

Τέλος, είμαι ευγνώμων για την συνεχή στήριξη και αγάπη της οικογένειάς μου που είναι πάντα δίπλα μου σε κάθε μου βήμα.

Μαρία Μισερλή

Αθήνα 2021

## Περίληψη

Η κιναζολινόνη ανήκει στην οικογένεια ετεροκυκλικών αζωτούχων ενώσεων και εμφανίζει σημαντικές βιολογικές δράσεις, όπως αντιβακτηριακές, αντικαρκινικές, αντιυπερτασικές και αντισπασμωδικές. Όμως, εμφανίζει περιορισμένη υδατοδιαλυτότητα και ως αποτέλεσμα μικρή βιοδιαθεσιμότητα.

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικοί, υδατοδιαλυτοί ολιγοσακχαρίτες που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενα μόρια D-γλυκόζης. Η τρισδιάστατη δομή τους είναι ένας κούλος κόλουρος κώνος. Εμφανίζουν μια υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια με μια υδρόφοβη εσωτερική κοιλότητα. Γι'αυτόν τον λόγο, είναι ικανά μόρια για να σχηματίσουν σύμπλοκα εγκλεισμού με πολλές ενώσεις.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο σχηματισμός συμπλόκων εγκλεισμού της κιναζολινόνης με την β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD), καθώς και με τις τροποποιημένες μεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (Me-β-CD) και 2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD). Η διαδικασία του εγκλεισμού στοχεύει στην βελτίωση της υδατοδιαλυτότητας και βιοδιαθεσιμότητας της κιναζολινόνης. Τα σύμπλοκα εγκλεισμού παρασκευάζονται με δύο μεθόδους: την υγρή λειοτρίβηση με σχηματισμό πάστας (kneading) και την εξάτμιση διαλύτη & λυοφιλοποίηση (solvent evaporation & freeze drying). Κατά την πρώτη μέθοδο, παρατηρούνται αποδόσεις διεργασίας 67-85% και εγκλεισμού 51-83%, ενώ κατά την δεύτερη μέθοδο 69-91% και 54- 87% αντίστοιχα.

Ακολουθεί χαρακτηρισμός των συμπλόκων ως προς το μέγεθος τους, τον δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και το ζ-δυναμικό μέσω της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS).

Επιπρόσθετα, τα σύμπλοκα μελετούνται αναφορικά με την δομή τους με χρήση φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (<sup>1</sup>H NMR) και φασματομετρίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR).

Ακόμα, πραγματοποιείται μελέτη απελευθέρωσης της κιναζολινόνης από τα σύμπλοκα σε συνθήκες pH=7.4 και θερμοκρασία 37°C και κινητική μοντελοποίηση. Εντοπίζεται το διφασικό προφίλ της απελευθέρωσης της κιναζολινόνης από τα σύμπλοκα που αποτελείται από ταχεία απελευθέρωση («burst effect») και στην συνέχεια απελευθέρωση με σταθερό ρυθμό («plateau»).

Τέλος, πραγματοποιείται μελέτη της αλληλεπίδρασης της κιναζολινόνης και των συμπλόκων εγκλεισμού με DNA θύμου αδένου βοειδούς (calf thymus DNA, ct-DNA) μέσω πειραματικών και υπολογιστικών μεθόδων. Από την μελέτη προκύπτει ότι η κιναζολινόνη αλληλεπιδρά με το DNA μέσω εξωτερικής συναρμογής στην μικρή αύλακα και σταθεροποιεί την δομή του DNA.

**Λέξεις – Κλειδιά:** κιναζολινόνη, β-κυκλοδεξτρίνες, σύμπλοκα εγκλεισμού, μελέτη απελευθέρωσης, αλληλεπίδραση με DNA

## Abstract

Quinazolinone is a nitrogen-rich heterocyclic scaffold that exhibits important biological properties, such as antibacterial, anticancer, antihypertensive and antispasmodic. However, its water solubility is limited and that results in its low bioavailability.

Cyclodextrins (CDs) are cyclic, water-soluble oligosaccharides, composed of several repeating D-glucose units. Their three-dimensional structure is considered as a truncated cone. Because of their hydrophilic outer surface and hydrophobic inner cavity, they present the ability to form inclusion complexes (ICs) with many compounds.

The aim of the present diploma thesis is to form quinazolinone inclusion complexes with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) as well as with the modified methyl- $\beta$ -cyclodextrin (Me- $\beta$ -CD) and 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD). The encapsulation process aims to improve the water-solubility and bioavailability of quinazolinone. The inclusion complexes are prepared by two methods; kneading method and solvent evaporation & freeze drying. According to the first method, process yields of 67-85% and encapsulation efficiencies (EE) of 51-83% are observed, while according to the second method process yields and EE are 69-91% and 54- 87% respectively.

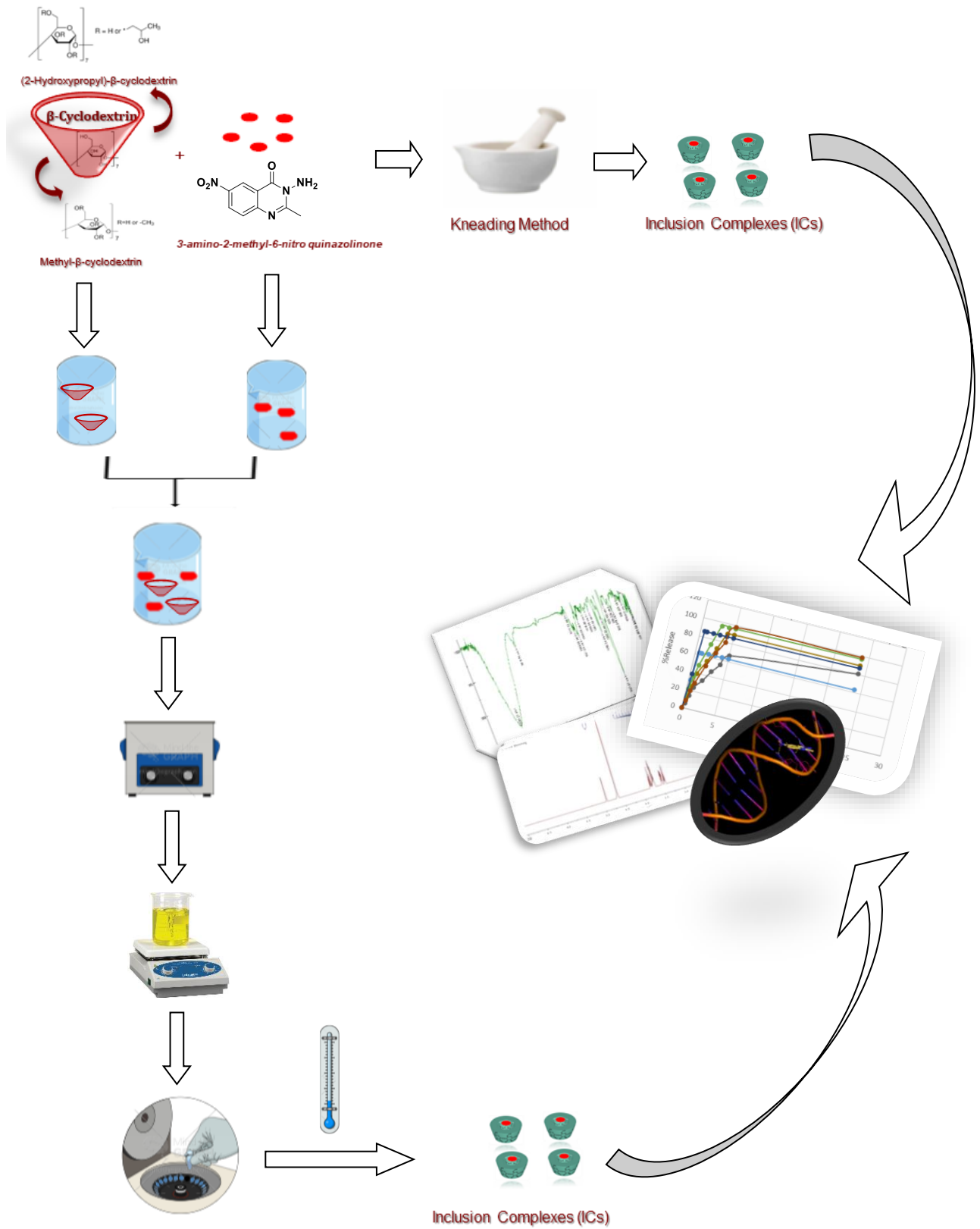
Characterization of the ICs in terms of their size, polydispersity index (PDI) and the zeta-potential is succeeded with Dynamic Light Scattering (DLS). In addition, the ICs are also studied according to their structure using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy ( $^1\text{H}$  NMR) and Fourier Transform Infrared Spectrometry (FT-IR).

Furthermore, a study of quinazolinone's release profile from the ICs is performed at pH=7.4 and temperature of 37°C. The biphasic profile of the ICs is identified, which consists of a higher initial release («burst effect») and then stabilization sustained release («plateau»).

Finally, the interaction of synthesized quinazolinone and ICs with calf thymus DNA (ct-DNA) is studied using both *in vitro* and *in silico* methods. Quinazolinone tends to interact with ct-DNA by binding to its minor groove, whilst stabilizing its structure.

**Key – words:** Quinazolinone,  $\beta$ -cyclodextrins, inclusion complexes, release study, DNA binding

# Graphical Abstract



## Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	1
Περίληψη.....	2
Abstract .....	3
Graphical Abstract.....	4
1. Θεωρητικό Μέρος .....	8
1.1 Κιναζολινόνες .....	8
1.1.1 Δομή .....	8
1.1.2 Τρόποι σύνθεσης 4-(3H)-κιναζολινονών.....	10
1.1.3 Βιολογικές ιδιότητες - Εφαρμογές .....	11
1.2 Κυκλοδεξτρίνες.....	13
1.2.1 Ιστορική αναδρομή .....	13
1.2.2 Δομή κυκλοδεξτρινών .....	13
1.2.3 Παραγωγή κυκλοδεξτρινών .....	15
1.2.4 Τοξικότητα κυκλοδεξτρινών .....	16
1.2.5 Εφαρμογές κυκλοδεξτρινών.....	16
1.3 Σύμπλοκα εγκλεισμού .....	17
1.3.1 Υπολογισμός στοιχειομετρίας φιλοξενούμενου μορίου – κυκλοδεξτρίνης ...	17
1.3.2 Τεχνικές συμπλοκοποίησης.....	18
1.4 Χαρακτηρισμός συμπλόκων εγκλεισμού .....	19
1.4.1 Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) – Υπολογισμός μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς και ζ – δυναμικού .....	19
1.4.2 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) .....	21
1.5 Απελευθέρωση φαρμάκου.....	22
1.5.1 Είδη και μηχανισμοί απελευθέρωσης .....	22
1.5.2 Προφίλ απελευθέρωσης .....	23
1.5.3 Κινητικά μοντέλα απελευθέρωσης .....	24
1.6 Αλληλεπίδραση ενώσεων με το DNA.....	28
1.6.1 Τρόποι αλληλεπίδρασης ενώσεων με το DNA.....	28
1.6.2 Αλληλεπίδραση οργανικών ενώσεων με το DNA .....	30
1.6.3 Αλληλεπίδραση κυκλοδεξτρινών με το DNA - Εφαρμογές .....	34
2. Πειραματικό Μέρος .....	37
2.1 Σκοπός .....	37
2.2 Όργανα – Συσκευές .....	38
2.3 Αντιδραστήρια.....	38
2.4 Μεθοδολογία σύνθεσης 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτροκιναζολιν-4(3H)-όνης.....	39

2.5	Παρασκευή συμπλόκων εγκλεισμού β-CD-κιναζολινόνης .....	40
2.5.1	Παρασκευή συμπλόκων εγκλεισμού μέσω υγρής λειοτρίβησης με σχηματισμό πάστας (Μέθοδος Kneading) .....	40
2.5.2	Παρασκευή συμπλόκων εγκλεισμού μέσω μεθόδου εξάτμισης διαλύτη και λυοφιλοποίησης (Μέθοδος solvent evaporation & freeze drying) .....	42
2.6	Χαρακτηρισμός συμπλόκων εγκλεισμού .....	42
2.6.1	Απόδοση διεργασίας των συμπλόκων κιναζολινόνης- κυκλοδεξτρίνης.....	42
2.6.2	Απόδοση εγκλεισμού των συμπλόκων κιναζολινόνης- κυκλοδεξτρίνης .....	42
2.6.3	Κατασκευή πρότυπης καμπύλης ένωσης μέσω φασματοφωτομετρίας υπεριώδους – ορατού (UV-Vis).....	43
2.6.4	Προσδιορισμός μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς PDI και ζ-δυναμικού μέσω Dynamic Light Scattering (DLS).....	43
2.6.5	Φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR .....	44
2.6.6	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (H-NMR).....	44
2.7	Μελέτη απελευθέρωσης.....	44
2.8	Βιολογικές δοκιμές – Αλληλεπίδραση με το DNA.....	45
2.8.1	Μελέτη αλληλεπίδρασης <i>in vitro</i> .....	45
2.8.2	Μελέτη αλληλεπίδρασης <i>in silico</i> .....	46
3.	Αποτελέσματα – συζήτηση .....	47
3.1	Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού .....	47
3.2	Απόδοση εγκλεισμού .....	48
3.3	Υπολογισμός μεγέθους, κατανομή μεγέθους και ζ-δυναμικό μέσω της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) .....	49
3.4	Φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).....	51
3.4.1	Φάσμα NMR της κιναζολινόνης .....	51
3.4.2	Φάσματα NMR της β-CD και συμπλόκου Quin-β-CD.....	52
3.5.1	Φάσμα FT-IR της κιναζολινόνης .....	54
3.5.2	Φάσματα β-CD και συμπλόκου Quin-β-CD .....	54
3.6	Μελέτη απελευθέρωσης κιναζολινόνης από τα σύμπλοκα εγκλεισμού.....	56
3.7	Αλληλεπίδραση DNA.....	60
3.7.1	Μελέτη αλληλεπίδρασης DNA μέσω τιτλοδότησης UV-Vis.....	60
3.7.2	Υπολογιστική μελέτη αλληλεπίδρασης με το DNA .....	63
4.	Συμπεράσματα .....	65
5.	Προτάσεις για μελλοντική έρευνα .....	66
	Παράρτημα Εικόνων.....	67
	Ευρετήριο Πινάκων .....	79
	Ευρετήριο Εικόνων.....	80

Ευρετήριο Διαγραμμάτων.....	83
Βιβλιογραφία .....	84

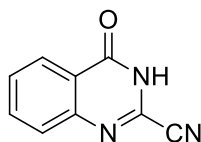


# 1. Θεωρητικό Μέρος

## 1.1 Κιναζολινόνες

Ετεροκυκλικές ενώσεις που περιέχουν άζωτο αποτελούν βασικές φαρμακοφόρες δομές και εμφανίζονται σε μια πληθώρα βιοδραστικών φυσικών προϊόντων, συνθετικών φαρμάκων, φαρμακευτικών και αγροχημικών.<sup>2</sup> Βασική κατηγορία τέτοιων ετεροκυκλικών ενώσεων που περιέχουν άζωτο είναι οι κιναζολινόνες.

Η κιναζολινόνη αποτελεί βασικό δομικό στοιχείο για περίπου 150 φυσικά απαντώμενα αλκαλοειδή που έχουν απομονωθεί από πληθώρα φυτών, ζώων και μικροοργανισμών. Αποτελεί σημαντική κατηγορία ενώσεων μεταξύ των αζωτούχων ετεροκυκλικών ενώσεων, λόγω των βιολογικών ιδιοτήτων της. Γι' αυτόν τον λόγο, περίπου το 1860 συντέθηκε η πρώτη κιναζολινόνη από ανθρανικό οξύ και κυανογόνο με προϊόν την 2-κυανοκιναζολινόνη (Εικόνα 1).<sup>4</sup>

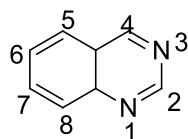


Εικόνα 1: Δομή της 2-κυανοκιναζολινόνης <sup>4</sup>

Το ενδιαφέρον για αυτές τις ενώσεις και την χρήση τους στην φαρμακευτική χημεία εκδηλώθηκε από το 1950 και μετά, έπειτα από την απομόνωση μιας αλκαλοειδούς κιναζολινόνης από το παραδοσιακό κινεζικό φυτό *Dichroa febrifuga*, το οποίο αποτελεί παραδοσιακό βοτανικό φάρμακο κατά της ελονοσίας.<sup>6</sup>

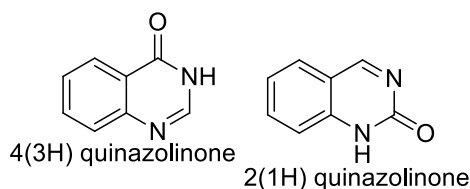
### 1.1.1 Δομή

Το όνομα κιναζολινόνη προτάθηκε από τον Widdege μετά από παρατήρησή του ότι πρόκειται για ισομερές της κινόξαλης και της κινόλης. Η βασική δομή των κιναζολινονών φαίνεται στην Εικόνα 2. Η αρίθμηση προτάθηκε από τους Paal και Busch και χρησιμοποιείται ακόμη.<sup>3,6</sup>



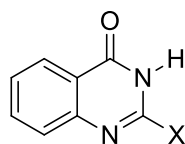
Εικόνα 2: Βασική δομή κιναζολινόνης <sup>3</sup>

Στην πιο σημαντική κατηγορία κιναζολινονών ανήκουν αυτές, στις οποίες η οξο- ομάδα βρίσκεται στην 2<sup>η</sup> ή 4<sup>η</sup> θέση του δακτυλίου και ονομάζονται 2-(1H)-κιναζολινόνη και 4-(3H)-κιναζολινόνη αντίστοιχα. Οι πιο διαδεδομένες στην συνθετική φαρμακοχημεία είναι οι 4-(3H)-κιναζολινόνες λόγω του εύρους των βιολογικών ιδιοτήτων τους.<sup>5,6</sup>

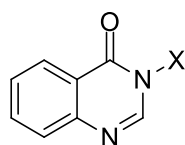


Εικόνα 3: Βασική δομή 2-(1H)-κιναζολινόνης και 4-(3H)-κιναζολινόνης<sup>6</sup>

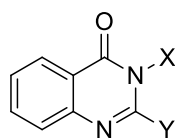
Οι 4-(3H)-κιναζολινόνες διαχωρίζονται στις παρακάτω κατηγορίες με βάση τους υποκαταστάτες του δακτυλίου. Αυτές είναι οι 2-υποκατεστημένες-4-(3H)-κιναζολινόνες, οι 3-υποκατεστημένες-4-(3H)-κιναζολινόνες και οι 2,3-διυποκατεστημένες-4-(3H)-κιναζολινόνες.<sup>6</sup>



Εικόνα 4: 2-υποκατεστημένη-4-(3H)-κιναζολινόνη<sup>5</sup>



Εικόνα 5: 3-υποκατεστημένη-4-(3H)-κιναζολινόνη<sup>5</sup>

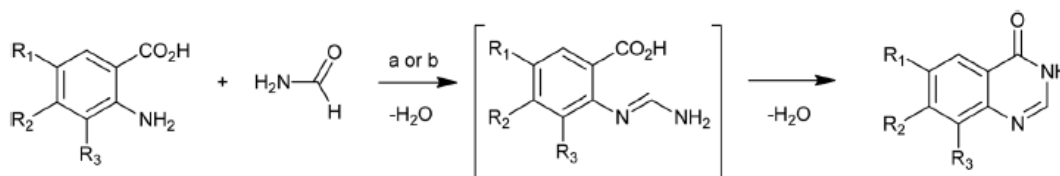


Εικόνα 6: 2,3-διυποκατεστημένη-4-(3H)-κιναζολινόνη<sup>5</sup>

### 1.1.2 Τρόποι σύνθεσης 4-(3H)-κιναζολινονών

Παρακάτω αναφέρονται κάποιοι από τους βασικούς τρόπους σύνθεσης των 4-(3H)-κιναζολινονών.

#### Σύνθεση Niementowski (συμπύκνωση ανθρανιλικού οξέος με αμίδια)

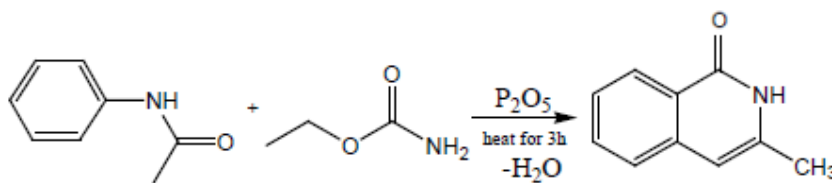


Εικόνα 7: Σύνθεση Niementowski. a) 130-150°C, 6h b) μικροκυματική ακτινοβολία 60W, 20min<sup>7</sup>

Αποτελεί την πιο κοινή μέθοδο για την σύνθεση 4-(3H)-κιναζολινονών και είναι γνωστή ως μέθοδος Niementowski. Βασίζεται στην συμπύκνωση του ανθρανιλικού οξέος με αμίδια στους 130 - 150°C, οδηγώντας σε ένα ενδιάμεσο ο-αμιδο-βενζαμιδίου (o-amido benzamide). Έχει παρατηρηθεί ότι η απόδοση μεταβάλλεται σε ένα μεγάλο εύρος και πολλές φορές έχει πάρει αρκετά χαμηλές τιμές, ενώ επίσης παράγονται μίγματα ανθρακούχων ενώσεων που δύσκολα εξαλείφονται.

Λύση σε αυτό το πρόβλημα έδωσε ο Besson, ο οποίος χρησιμοποίησε μικροκυματική ακτινοβολία βελτιώνοντας έτσι τις αποδόσεις, αλλά και τον χρόνο αντίδρασης.<sup>7</sup>

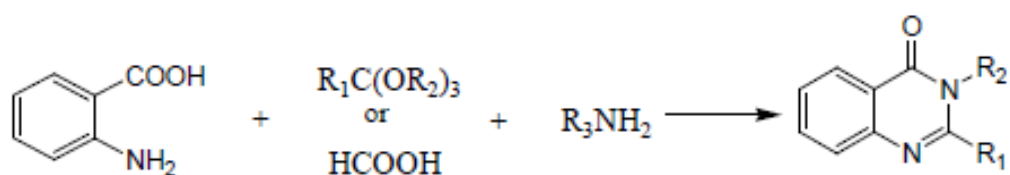
#### Συμπύκνωση ακετανιλιδίων με ουρεθάνες



Εικόνα 8: Συμπύκνωση ουρεθάνης με ακετανιλίδη<sup>6</sup>

Σύμφωνα με αυτήν την μέθοδο, πραγματοποιείται συμπύκνωση ενός παραγώγου ουρεθάνης με ανιλίνη και λαμβάνεται ως προϊόν μια 4-(3H)-κιναζολινόνη. Συγκεκριμένα, η 2-μεθυλο-4-(3H)-κιναζολινόνη συντέθηκε με θέρμανση ουρεθάνης και ακετανιλίδης για 3 ώρες παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου σε τολουόλιο.

### Συμπύκνωση N-ακυλανθρανιλικών οξέων με πρωτοταγείς αμίνες



Εικόνα 9: Αντίδραση συμπύκνωσης ακυλανθρανιλικού οξέος με πρωτοταγής αμίνη <sup>6</sup>

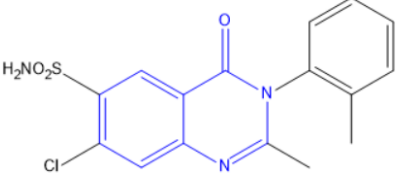
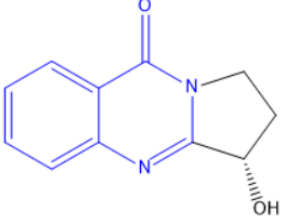
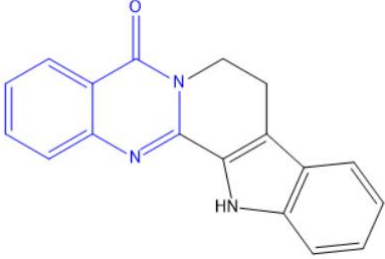
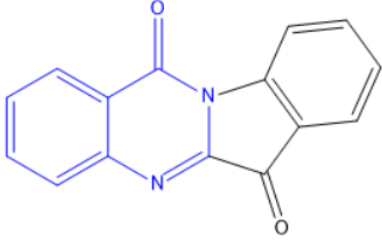
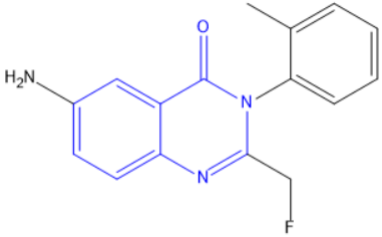
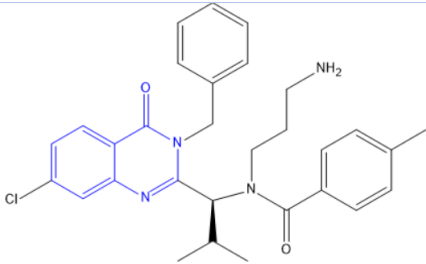
Οι 4-(3H)-κιναζολινόνες μπορούν να συντεθούν από το αντίστοιχο N-ακυλανθραϊλικό οξύ με αμμωνία ή πρωτοταγείς αμίνες με θέρμανση. Σύμφωνα με αυτήν την μέθοδο, από πρωτοταγείς αμίνες και το N-ακυλο-5-νιτρο-ανθρανιλικό οξύ έχει συντεθεί η 2-μεθυλο-3-αλκυλο-6-νιτρο-4-(3H)-κιναζολινόνη σε πολύ καλές αποδόσεις.<sup>6</sup>

#### 1.1.3 Βιολογικές ιδιότητες - Εφαρμογές

Οι κιναζολινόνες, ιδιαίτερα οι 4-(3H)-κιναζολινόνες, είναι από τις σημαντικότερες φαρμακολογικά κατηγορίες ετεροκυκλικών ενώσεων. Η σταθερότητα του πυρήνα τους ανέπτυξε το ενδιαφέρον πολλών χημικών, οι οποίοι εισήγαγαν σε αυτόν βιοδραστικές ομάδες με σκοπό να συνθέσουν νέους φαρμακευτικούς παράγοντες. Ο δομικός σκελετός της κιναζολινόνης εμφανίζεται σε διάφορες εφαρμογές της φαρμακευτικής χημείας, όπως αντιβακτηριακές, αναλγητικές, αντικαρκινικές, αντιμυκητιασικές, αντιυπερτασικές, αντισπασμωδικές κ.ά. Παρακάτω αναγράφονται διάφορες φαρμακευτικές ενώσεις, οι οποίες φέρουν τον βασικό σκελετό της κιναζολινόνης και χρησιμοποιούνται ευρέως λόγω των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους.<sup>6</sup>

Πίνακας 1: Παραδείγματα φαρμακευτικών κιναζολινονών και η θεραπευτική τους ιδιότητα <sup>4,6</sup>

Φυσικές / συνθετικές κιναζολινόνες	Θεραπευτική ιδιότητα
 <b>Febrifugine</b>	Αντι-ελονοσιακό συστατικό σε παραδοσιακό κινεζικό βοτανικό φάρμακο
 <b>Methaqualone</b>	Ηρεμιστικό - υπνωτικό

 <p><b>Metolazone</b></p>	<p>Διουρητικό</p>
 <p><b>Vasicinone</b></p>	<p>Αντικαρκινικό, βρογχοδιασταλτικό, υποτασικό, αντι-αναφυλακτικό Χρησιμοποιείται ως φάρμακο για το κρυολόγημα, τον βήχα, τη βρογχίτιδα, τους ρευματισμούς, τη φθίση και το άσθμα</p>
 <p><b>Rutaecarpine</b></p>	<p>Ισχυρή αναλγητική, αντιεμετική, αντιυπερτασική, αντιεπιληπτική, αντιφλεγμονώδης δράση Χρησιμοποιείται κατά του Alzheimer</p>
 <p><b>Tryptanthrin</b></p>	<p>Αντιβιοτικό</p>
 <p><b>Afloqualone</b></p>	<p>Ηρεμιστικό, υπνωτικό, αντικαρκινικό, αγχολυτικό</p>
 <p><b>Ispinesib</b></p>	<p>Αντικαρκινικό</p>

## 1.2 Κυκλοδεξτρίνες

Οι κυκλοδεξτρίνες (CDs) είναι κυκλικοί, υδατοδιαλυτοί ολισακχαρίτες που αποτελούνται από μονάδες D-γλυκόζης με α-D-(1,4)-γλυκοζυτικούς δεσμούς. Παράγονται από την κατεργασία του αμύλου μέσω του ενζύμου γλυκοζυλοτρανσφεράση της κυκλοδεξτρίνης (CGTase), το οποίο προέρχεται από μικροοργανισμούς.

Η τρισδιάστατη δομή των κυκλοδεξτρινών είναι ένας κοίλος κόλινος κώνος. Πιο συγκεκριμένα, οι κυκλοδεξτρίνες παρουσιάζουν μια υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια, που μπορεί να διαλυθεί στο νερό και μια υδρόφοβη κοιλότητα δημιουργώντας ένα μικρο-ετερογενές περιβάλλον. Αυτό τις καθιστά ιδιαίτερα ελκυστικές επιλογές για τον εγκλεισμό μορίων, καθώς μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα εγκλεισμού με μια πληθώρα υδρόφοβων μορίων.<sup>9,13</sup>

Εφαρμόζονται ευρέως λόγω της προέλευσης τους, τις σχετικά χαμηλές τιμές κόστους, τις εύκολες τροποποιήσεις τους και τη βιοαποικοδομησιμότητά τους. Επίσης, χαρακτηρίζονται μη τοξικές εφόσον δεν μπορούν να απορροφηθούν από τον γαστρεντερικό σωλήνα, ενώ μεταβολίζονται από την μικροχλωρίδα του εντέρου.<sup>8</sup>

### 1.2.1 Ιστορική αναδρομή

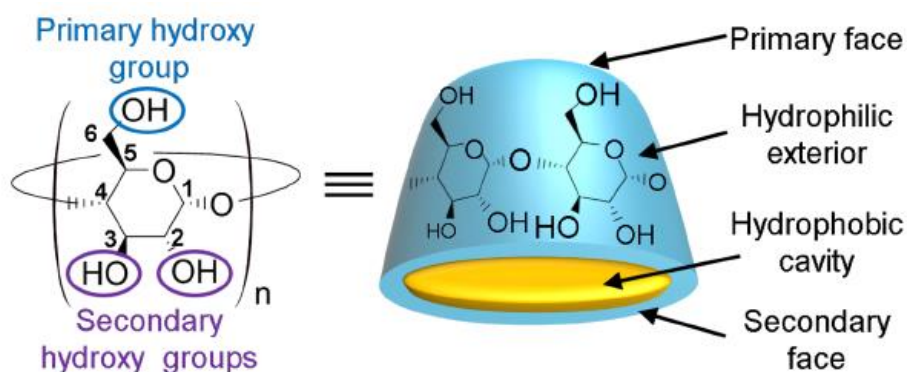
Οι κυκλοδεξτρίνες ανακαλύφθηκαν στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα από τον γάλλο επιστήμονα Antoine Villiers, ο οποίος κατά την βακτηριακή αποικοδόμηση του αμύλου απομόνωσε μια κρυσταλλική ουσία σε πολύ μικρή ποσότητα (3g/kg αμύλου), την οποία ονόμασε “cellulosine”. Το 1904, ο F. Schardinger απομόνωσε έναν καινούργιο μικροοργανισμό, τον *Bacillus macerans*, ικανό να παράγει ακετόνη και αιθυλική αλκοόλη από φυτική ύλη που περιέχει ζάχαρη.

Λίγα χρόνια αργότερα παρατηρήθηκε ότι ο μικροοργανισμός αυτός έχει την δυνατότητα να παράγει σε μεγάλες ποσότητες (25-30%) δύο κρυσταλλικές ουσίες από το άμυλο. Ο F. Schardinger ονόμασε τα δύο αυτά κρυσταλλικά προϊόντα “κρυσταλλική δεξτρίνη α” και “κρυσταλλική δεξτρίνη β”. Το 1935, ο επιστήμονας Freudenberg ανακάλυψε και απομόνωσε μια παρόμοια ουσία, την “γ-δεξτρίνη”. Οι κυκλικές δομές των τριών δεξτρινών προσδιορίστηκαν με την χρήση κρυσταλλογραφίας ακτινών X και βρέθηκε ότι μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα εγκλεισμού. Το πρώτο εμπορικό κατασκεύασμα κυκλοδεξτρίνης, το οποίο περιείχε εγκλεισμένα μόρια προσταλαγδίνης, κυκλοφόρησε το 1976 στην Ιαπωνία.<sup>9,11</sup>

### 1.2.2 Δομή κυκλοδεξτρινών

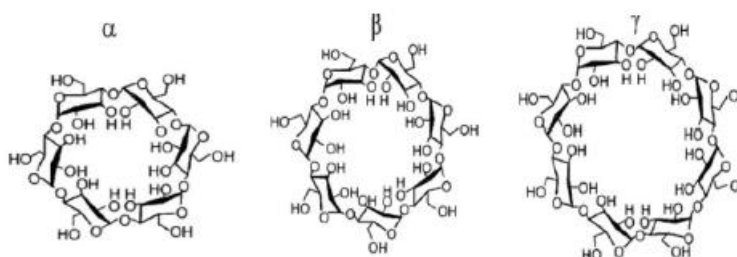
Οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικοί, υδατοδιαλυτοί ολιγοσακχαρίτες που παράγονται από την αποικοδόμηση και κυκλοποίηση του αμύλου, μέσω της δράσης του ενζύμου γλυκοζυλοτρανσφεράση της κυκλοδεξτρίνης (CGTase). Αποτελούνται από μονάδες D-γλυκόζης που συνδέονται με α-D-(1,4)-γλυκοζυτικούς δεσμούς, δημιουργώντας μια τρισδιάστατη δομή κοίλου κόλινου κώνου. Χαρακτηρίζονται για το μικρο-ετερογενές περιβάλλον που δημιουργούν, καθώς αποτελούνται από μια υδρόφοβη εσωτερική κοιλότητα και από μια υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια. Συνεπώς, οι κυκλοδεξτρίνες είναι

υδατοδιαλυτές ενώσεις, ικανές να σχηματίσουν σύμπλοκα εγκλείνοντας στο εσωτερικό τους υδρόφοβα μόρια. Αυτή η ιδιότητα τις καθιστά ιδιαίτερα ελκυστικές επιλογές για πληθώρα εφαρμογών.<sup>9,10</sup>



Εικόνα 10: Δομή κυκλοδεξτρίνης<sup>8</sup>

Οι πιο κοινές κυκλοδεξτρίνες αποτελούνται από έξι, επτά και οχτώ μονάδες D-γλυκόζης και είναι αντίστοιχα οι  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD και  $\gamma$ -CD. Το ύψος της κοιλότητας είναι το ίδιο σε κάθε περίπτωση, ανεξάρτητο από το πλήθος των μορίων γλυκόζης, ενώ η διάμετρος τους, η οποία καθορίζεται από τις μονάδες γλυκόζης, είναι διαφορετική.<sup>13</sup>



Εικόνα 11: Οι πιο κοινές κυκλοδεξτρίνες:  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD<sup>10</sup>

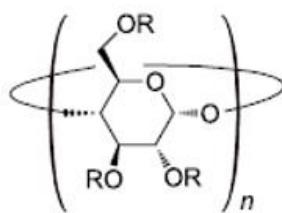
Πίνακας 2: Βασικά χαρακτηριστικά  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD<sup>10</sup>

Χαρακτηριστικά	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Μονάδες γλυκόζης	6	7	8
Μοριακό βάρος	972	1135	1297
Διάμετρος κοιλότητας (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Ύψος κοιλότητας (Å)	7.9	7.9	7.9
Εξωτερική διάμετρος (Å)	14.6	15.4	17.5
Όγκος της κοιλότητας (Å <sup>3</sup> )	174	262	427
Διαλυτότητα στο νερό στους 25°C (g/100 mL)	14.5	1.85	23.2

Από τις παραπάνω φυσικές κυκλοδεξτρίνες, η β-CD χρησιμοποιείται περισσότερο καθώς έχει το χαμηλότερο κόστος παραγωγής και είναι η πιο προσβάσιμη. Επίσης, χρησιμοποιείται ευρέως στα αρχικά στάδια φαρμακευτικών εφαρμογών καθώς το μέγεθος της κοιλότητάς της είναι πιο κατάλληλο από τις υπόλοιπες κυκλοδεξτρίνες για τον εγκλεισμό πολλών χρήσιμων φαρμακευτικών μορίων. Όμως, παρατηρείται ότι η διαλυτότητα των α- και γ-κυκλοδεξτρινών είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την διαλυτότητα της β-κυκλοδεξτρίνης. Αυτό συμβαίνει καθώς τα υδροξύλια προσανατολίζονται με τέτοιο τρόπο που επιτρέπουν τον σχηματισμό διαμοριακών δεσμών υδρογόνου.

Παρόλα αυτά, η φυσική β-CD αποτελεί πρότυπο για την δημιουργία χημικά τροποποιημένων κυκλοδεξτρινών. Οι τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες συνήθως παράγονται με αντικατάσταση των πρωτοταγών ή δευτεροταγών υδροξυλίων. Με την αντικατάσταση των υδροξυλίων, οι τροποποιημένες β-κυκλοδεξτρίνες σπάνε τους διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου και αυξάνουν την διαλυτότητα.<sup>8,9,11</sup>

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν, εκτός από την β-CD, δύο τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες, η μεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (Me-β-CD) και η 2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD). Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η δομή των τριών κυκλοδεξτρινών για n (μονάδες D-γλυκόζης) = 7.



**R = H**

**R = CH<sub>3</sub>**

**R = CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub>**

Εικόνα 12: Δομή β-κυκλοδεξτρίνης (R=H), μεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνης (R=CH<sub>3</sub>) και 2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης (R=CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub>)<sup>8</sup>

### 1.2.3 Παραγωγή κυκλοδεξτρινών

Οι κυκλοδεξτρίνες παράγονται από την ενζυμική αποικοδόμηση του αμύλου μέσω του ενζύμου γλυκοζυλοτρανσφεράση της κυκλοδεξτρίνης (CGTase). Η πρώτη αναφορά για την ενζυμική αυτή διεργασία παραγωγής κυκλοδεξτρινών από άμυλο αφορούσε στέλεχος του μικροοργανισμού *Bacillus macerans*, ο οποίος χρησιμοποίησε το ένζυμο CGTase. Το ένζυμο αυτό είναι εξωκυτταρικό και έχει εντοπιστεί και σε άλλα βακτήρια εκτός από το γένος *Bacillus*, όπως *Raenibacillus*, *Klebsiella*, *Thermoanaerobacterium* και *Actinomycetes*.

Σε βιομηχανική κλίμακα ακολουθούνται δύο τρόποι παραγωγής κυκλοδεξτρινών. Ο πρώτος και ο πιο διαδεδομένος αφορά την παραγωγή με χρήση διαλυτών, όπου ένας οργανικός παράγοντας συμπλοκοποίησης καθιζάνει επιλεκτικά τον επιθυμητό τύπο της κυκλοδεξτρίνης και κατευθύνει την αντίδραση του ενζύμου για την παραγωγή ακριβώς αυτού του τύπου.

Αρχικά, πραγματοποιείται ρευστοποίηση του αμύλου σε υψηλή θερμοκρασία. Έπειτα, ακολουθεί ψύξη έως την θερμοκρασία δράσης του ενζύμου CGTase και προσθέτονται οι



οργανικοί παράγοντες συμπλοκοποίησης. Το ένζυμο ξεκινάει την διαδικασία παραγωγής των κυκλοδεξτρινών, από τις οποίες ο επιθυμητός τύπος θα δημιουργήσει ένα σύμπλεγμα με τους παράγοντες συμπλοκοποίησης και θα καθιζάνει. Το σύμπλεγμα αυτό απομακρύνεται από το διάλυμα με φυγοκέντρηση ή διήθηση, εκπλένεται και αποστάζεται για την απομάκρυνση περισσειας παραγόντων συμπλοκοποίησης. Έπειτα, εναιωρείται σε νερό και διασπάται με θέρμανση. Ο παράγοντας συμπλοκοποίησης απομακρύνεται μέσω απόσταξης με ατμό ή με εκχύλιση και παραλαμβάνεται το διάλυμα των κυκλοδεξτρινών, το οποίο συμπυκνώνεται και κρυσταλλοποιείται.

Ο δεύτερος τρόπος δεν απαιτεί παράγοντες συμπλοκοποίησης και παράγει ένα μίγμα κυκλοδεξτρινών. Αρχικά, πραγματοποιείται η ρευστοποίηση του αμύλου και η ενζυματική μετατροπή, όπως και στη πρώτη μέθοδο. Η διαφορά εδώ έγκειται στο ότι δεν χρησιμοποιούνται παράγοντες συμπλοκοποίησης. Στο τέλος της μετατροπής, το ένζυμο CGTase απενεργοποιείται και προστίθεται γλυκοαμυλάση, η οποία μετατρέπει υπόλειμμα αμύλου και άκυκλες κυκλοδεξτρίνες σε γλυκόζη και μαλτόζη. Στη συνέχεια, το διάλυμα διηθείται και συμπυκνώνεται. Ακολουθεί κρυστάλλωση και το καταβυθισμένο μίγμα κυκλοδεξτρινών απομονώνεται, εκπλένεται, φυγοκεντρείται και ξηραίνεται.<sup>14,15</sup>

#### 1.2.4 Τοξικότητα κυκλοδεξτρινών

Στην περίπτωση χορήγησης από το στόμα, οι φυσικές κυκλοδεξτρίνες θεωρούνται μη τοξικές καθώς δεν απορροφώνται από τον γαστρεντερικό σωλήνα λόγω της υψηλής μοριακής μάζας τους. Αναφορικά με την παρεντερική χορήγηση, τα υδρόφιλα παράγωγα κυκλοδεξτρινών, όπως η HP-β-CD, θεωρούνται ασφαλή. Αυτό συμβαίνει, διότι μετά την χορήγηση εξαφανίζονται γρήγορα από την συστηματική κυκλοφορία και κατανέμονται σε διάφορους ιστούς του σώματος, όπως στα νεφρά, στο συκώτι και στην ουροδόχο κύστη. Αντιθέτως, έχει αποδειχθεί ότι τα λιπόφιλα παράγωγα, όπως η Me-β-CD, είναι τοξικά μετά από παρεντερική χρήση.<sup>8</sup>

#### 1.2.5 Εφαρμογές κυκλοδεξτρινών

Οι κυκλοδεξτρίνες, λόγω της υδρόφοβης κοιλότητας τους και της υδρόφιλης εξωτερικής τους επιφάνειας, παρουσιάζουν την ικανότητα να αλληλεπιδράσουν με υδρόφοβα βιοενεργά στοιχεία και μόρια και να τα εγκλείσουν στο εσωτερικό τους. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται σύμπλοκα εγκλεισμού, γνωστά και ως "host-guest inclusion complexes" (ICs). Οι κυκλοδεξτρίνες έχουν εφαρμοστεί ως φορείς εγκλεισμού για διάφορες ενώσεις όπως αλδεύδες, κετόνες, αλκοόλες, οργανικά και λιπαρά οξέα, αρωματικές και αλειφατικές ενώσεις, αλογόνα και αμίνες.

Οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται ευρέως σε φαρμακευτικά σκευάσματα καθώς τροποποιούν και βελτιώνουν τις φυσικές και χημικές ιδιότητες φαρμακευτικών ουσιών. Η κυριότερη τροποποίηση είναι η αύξηση της διαλυτότητας πολλών φαρμακευτικών ουσιών στο νερό, γεγονός που βελτιώνει την βιοδιαθεσιμότητα τους και αυξάνει την φαρμακολογική δράση τους, επιτρέποντας την μείωση της δόσης που χορηγείται. Πιο συγκεκριμένα, διατηρούν και προστατεύουν μέσω της υδροφιλίας τους τις φαρμακευτικές ενώσεις στο

υδατικό διάλυμα και τις μεταφέρουν στην επιφάνεια των βιολογικών μεμβρανών. Έτσι, έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε υδατικά δερματικά σκευάσματα, υδατικά στοματικά διαλύματα, ρινικά συστήματα χορήγησης φαρμάκου και οφθαλμολογικές σταγόνες.<sup>9,13</sup>

### 1.3 Σύμπλοκα εγκλεισμού

Οι κυκλοδεξτρίνες χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να δημιουργήσουν σύμπλοκα εγκλεισμού με υδρόφοβα μόρια υγρής, στερεής ή αέριας μορφής, λόγω της υδρόφοβης εσωτερικής κοιλότητας τους. Η κινητήρια δύναμη για την δημιουργία συμπλόκων είναι η απελευθέρωση μορίων νερού από την εσωτερική κοιλότητα των κυκλοδεξτρινών, όταν αυτές βρίσκονται σε ένα υδατικό διάλυμα και η αντικατάστασή τους με περισσότερο υδρόφοβα μόρια. Έτσι, με την απομάκρυνση των μορίων νερού, τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλή ενθαλπία, επιτυγχάνεται μια σταθερή κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας.

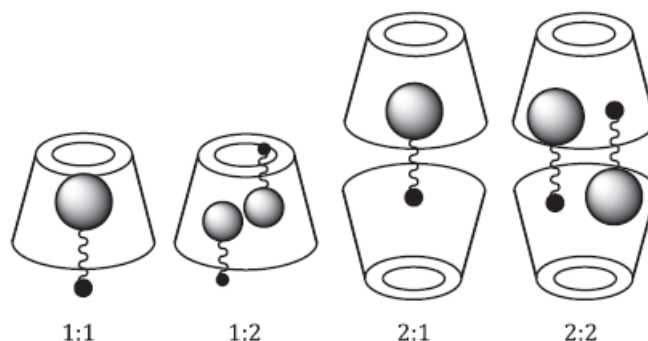
Συνεπώς, η δημιουργία των συμπλόκων δεν επιτυγχάνεται από κάποιο χημικό δεσμό αλλά είναι συνάρτηση δύο βασικών παραγόντων. Πρώτον, σημαντικό ρόλο παίζει το μέγεθος του εγκλεισμένου μορίου (guest molecule) καθώς θα πρέπει να μπορεί να παγιδευτεί μέσα στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης. Συνεπώς, οι α-κυκλοδεξτρίνες είναι κατάλληλες να εγκλείσουν μικρού μοριακού βάρους μόρια, οι β-κυκλοδεξτρίνες είναι ιδανικές για αρωματικά και ετεροκυκλικά μόρια και οι γ-κυκλοδεξτρίνες για μεγάλα μόρια, όπως στεροειδή. Ο δεύτερος παράγοντας είναι οι θερμοδυναμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της κυκλοδεξτρίνης, της εγκλεισμένης ουσίας και του διαλύτη, οι οποίες θα πρέπει να δημιουργούν ένα ενεργειακά ευνοϊκό περιβάλλον για την επίτευξη του εγκλεισμού. Συμπερασματικά, τα σύμπλοκα εγκλεισμού οφείλονται κυρίως σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ή αλληλεπιδράσεις Van der Waals και ο σχηματισμός τους αποτελεί μια αναστρέψιμη κατάσταση δυναμικής ισορροπίας.

Με τον εγκλεισμό τους σε κυκλοδεξτρίνες, τα υδρόφοβα εγκλεισμένα μόρια υφίστανται επιθυμητές τροποποιήσεις στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Τέτοιες τροποποιήσεις είναι η ενίσχυση της διαλυτότητας και επομένως της βιοδιαθεσιμότητας, η σταθεροποίηση των ασταθών αυτών μορίων με την προστασία τους από εξωτερικούς παράγοντες όπως θερμότητα, οξυγονούχες ουσίες και φως, ο έλεγχος της πτητικότητάς τους, η επικάλυψη ανεπιθύμητων γεύσεων και οσμών και η ελεγχόμενη απελευθέρωση της δραστικής ουσίας που έχει εγκλειστεί.<sup>9,11,13</sup>

#### 1.3.1 Υπολογισμός στοιχειομετρίας φιλοξενούμενου μορίου – κυκλοδεξτρίνης

Η αναλογία φιλοξενούμενου μορίου/κυκλοδεξτρίνης για τον σχηματισμό συμπλόκων μπορεί να διαφέρει. Ένα βασικό εργαλείο για την πρόβλεψη της είναι η μέθοδος Job's Plot. Με την συγκεκριμένη μέθοδο, μετρίεται η απορρόφηση δειγμάτων που περιέχουν την φιλοξενούμενη ένωση μαζί με την κυκλοδεξτρίνη σε διαφορετικές, κάθε φορά, συγκεντρώσεις. Κατασκευάζεται διάγραμμα  $\Delta A \times R$  συναρτήσεως του R, όπου  $\Delta A$  η διαφορά της απορρόφησης της ένωσης με και χωρίς την κυκλοδεξτρίνη, ενώ το μέγεθος R ισούται με το κλάσμα συγκεντρώσεων  $\frac{[\text{ένωση}]}{[\text{ένωση}] + [\text{CD}]}$ .

Η τιμή του R που αντιστοιχεί στην μέγιστη τιμή του  $\Delta A \times R$  καθορίζει την στοιχειομετρία των συστατικών των συμπλόκων εγκλεισμού. Για παράδειγμα, τιμή R ίση με 0.5 αφορά σύμπλοκα με αναλογία 1:1, τιμή R ίση με 0.33 αφορά σύμπλοκα με 2:1 ενώ R ίσο με 0.66 σύμπλοκα 1:2.<sup>38</sup>



Εικόνα 13: Πιθανές αναλογίες φιλοξενούμενου μορίου/κυκλοδεξτρίνης προς σχηματισμό συμπλόκων<sup>38</sup>

### 1.3.2 Τεχνικές συμπλοκοποίησης

Οι τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για την σύνθεση των συμπλόκων εγκλεισμού είναι οι εξής:

- Μέθοδος υγρής λειοτρίβησης με σχηματισμό πάστας (Kneading)
- Μέθοδος συγκαταβύθισης (Co-precipitation)
- Μέθοδος εξάτμισης διαλύτη (Solvent evaporation)
- Λυοφιλοποίηση (freeze drying/ lyophilization)
- Ξήρανση με ψεκασμό (spray drying)

#### **Σχηματισμός συμπλόκων με υγρή λειοτρίβηση και σχηματισμό πάστας (μέθοδος kneading)**

Η ουσία προς εγκλεισμό και η κυκλοδεξτρίνη σε διαφορετικές γραμμομοριακές αναλογίες αναμειγνύονται σε ιγδίο μαζί με μικρή ποσότητα νερού και κονιορτοποιούνται μέχρις ότου λάβουν την μορφή πάστας. Έπειτα, τοποθετούνται σε ξηραντήρα θαλάμου κενού για απομάκρυνση της υγρασίας.<sup>11</sup>

#### **Σχηματισμός συμπλόκων με συγκαταβύθιση (μέθοδος co-precipitation)**

Σύμφωνα με αυτήν την μέθοδο, η ουσία που θα εγκλειστεί διαλύεται σε οργανικό διαλύτη, ενώ η κυκλοδεξτρίνη διαλυτοποιείται σε νερό δημιουργώντας ένα υδατικό διάλυμα. Το οργανικό διάλυμα της ουσίας αναμειγνύεται με το υδατικό διάλυμα της κυκλοδεξτρίνης με κατάλληλη ανάδευση και θέρμανση για την δημιουργία ενός κορεσμένου διαλύματος. Στην συνέχεια, έπειτα από ψύξη και έκπλυση με οργανικό διαλύτη παραλαμβάνονται τα σύμπλοκα εγκλεισμού.<sup>11</sup>

### **Σχηματισμός συμπλόκων με εξάτμιση διαλύτη (μέθοδος solvent evaporation)**

Η ουσία προς εγκλεισμό και η κυκλοδεξτρίνη διαλυτοποιήθηκαν σε διαφορετικούς διαλύτες, οι οποίοι είναι αναμειξίμοι. Έπειτα από ανάμειξη τους, λαμβάνεται ένα μίγμα με διασπορά και των δυο αυτών ενώσεων. Οι διαλύτες απομακρύνονται με εξάτμιση υπό κενό στους 45°C και τελικά παραλαμβάνεται μια συμπαγής συμπυκνωμένη σκόνη πούδρας, η οποία περιέχει τα σύμπλοκα εγκλεισμού.<sup>11</sup>

### **Σχηματισμός συμπλόκων με λυοφιλοποίηση (freeze drying/ lyophilization)**

Αυτή η μέθοδος είναι η πιο κατάλληλη για τον σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού κυκλοδεξτρίνης με θερμοευαίσθητη ένωση. Σύμφωνα με την συγκεκριμένη μέθοδο, η ένωση και η κυκλοδεξτρίνη διαλύονται σε κατάλληλο διαλύτη με ανάδευση και στην συνέχεια πραγματοποιείται λυοφιλοποίηση. Η λυοφιλοποίηση αφορά την διαδικασία της ψυχρής ξήρανσης του δείγματος, κατά την οποία τα μόρια του νερού εξαχνώνονται. Έπειτα, ο διαλύτης απομακρύνεται με εξάτμιση υπό κενό και λαμβάνονται καλής ποιότητας σύμπλοκα εγκλεισμού.<sup>11,12</sup>

### **Σχηματισμός συμπλόκων μέσω ξήρανσης με ψεκασμό (spray drying)**

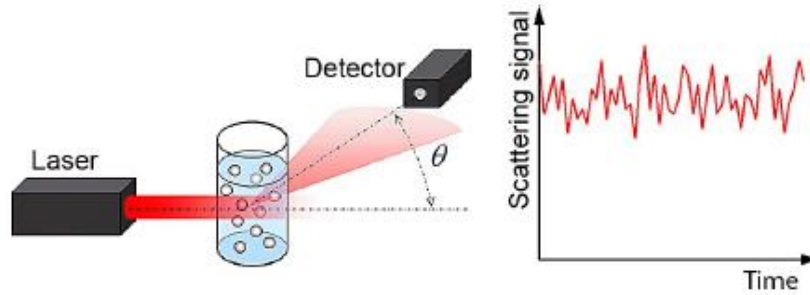
Η προς εγκλεισμό ουσία και η κυκλοδεξτρίνη διαλύονται σε κοινό διαλύτη και ακολουθεί ξήρανση με χρήση ψεκαστήρα. Το μέγεθος των συμπλόκων ελέγχεται από διάφορες παραμέτρους, όπως το μέγεθος του ακροφυσίου του ψεκαστήρα, τον ρυθμό τροφοδοσίας του δείγματος και την θερμοκρασία.<sup>11</sup>

## 1.4 Χαρακτηρισμός συμπλόκων εγκλεισμού

### 1.4.1 Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) – Υπολογισμός μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς και ζ – δυναμικού

Η δυναμική σκέδαση φωτός είναι μια μη-επεμβατική, γρήγορη και οικονομική μέθοδος για την μέτρηση μεγέθους, κατανομής μεγέθους και ζ – δυναμικού ενός νανοκολλοειδούς συστήματος διασποράς.

Μέσα σε ένα διάλυμα, τα σωματίδια βρίσκονται σε διαρκή κίνηση (κίνηση Brown). Με την μέθοδο DLS, η κίνηση αυτή ποσοτικοποιείται και προσδιορίζεται ο συντελεστής διάχυσης D. Η ποσοτικοποίηση της κίνησης Brown επιτυγχάνεται μέσω των δεδομένων που συλλέγονται για το σκεδαζόμενο φως. Πιο συγκεκριμένα, το διάλυμα φωτοβολείται με μονοχρωματική ακτινοβολία (laser) και καταγράφονται οι διακυμάνσεις στην ένταση του σκεδαζόμενου φωτός. Οι διακυμάνσεις αυτές οφείλονται στην κίνηση Brown των σωματιδίων.



Εικόνα 14: Τρόπος λειτουργίας του DLS <sup>17</sup>

Αναλύοντας τις διακυμάνσεις της έντασης, προσδιορίζεται ο συντελεστής διάχυσης  $D$  και μέσω της εξίσωσης Stokes – Einstein υπολογίζεται η μέση υδροδυναμική διάμετρος, η οποία εκφράζει το μέγεθος των νανοσωματιδίων.

$$\text{Εξίσωση Stokes – Einstein: } D_h = \frac{k_B \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D}$$

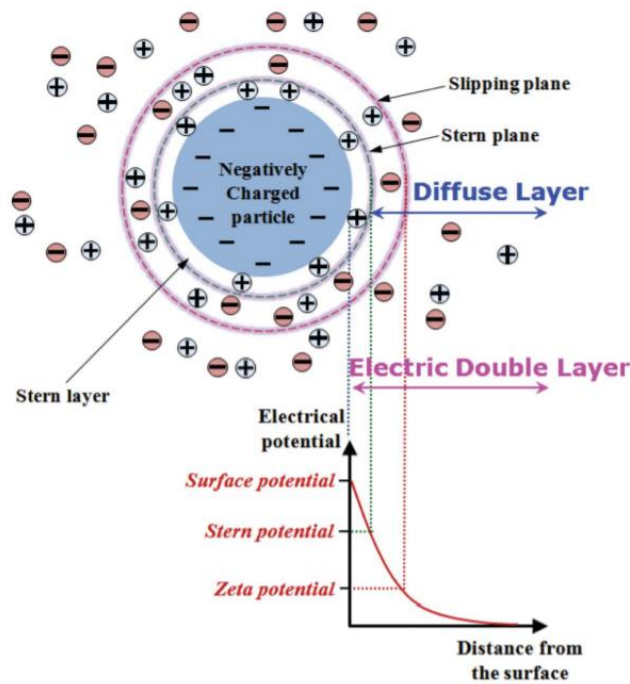
όπου  $D_h$  η μέση υδροδυναμική διάμετρος,  $k_B$  η σταθερά Boltzmann,  $T$  η θερμοκρασία,  $\eta$  το ιξώδες του διαλύτη και  $D$  ο συντελεστής διάχυσης.

Η μέση υδροδυναμική διάμετρος αναφέρεται σε μεμονομένα σωματίδια και αντανακλά τις εξωτερικές διαστάσεις, χωρίς όμως να σχετίζεται με το πραγματικό μέγεθος των σωματιδίων.<sup>16,17</sup>

Ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) εκφράζει την ομοιομορφία των νανοσωματιδίων. Η κατανομή του μεγέθους τους είναι ένα μέτρο της σταθερότητας τους. Χαμηλές τιμές του μεγέθους PDI ( $< 0.05$ ) σημαίνει ότι στο δείγμα τα μεγέθη των σωματιδίων δεν διαφέρουν σημαντικά και άρα υπάρχει μονοδιασπορά, ενώ μεγάλες τιμές του PDI ( $> 0.7$ ) υποδεικνύουν μεγάλο εύρος μεγεθών των σωματιδίων και συνεπώς πολυδιασπορά. Στα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, ένας δείκτης πολυδιασποράς με τιμή κοντά στο 0.3 είναι αποδεκτός και θεωρείται ότι υπάρχει μονοδιασπορά.<sup>17,21</sup>

Στις διεπιφάνειες στερεού – υγρού εμφανίζεται μια χωρική κατανομή ηλεκτρικών φορτίων λόγω διάσπασης επιφανειακών ομάδων ή προσρόφησης ιόντων, η οποία οδηγεί στον σχηματισμό δύο φορτισμένων στιβάδων που περιβάλλουν τα νανοσωματίδια. Οι στιβάδες αυτές είναι οι εξής:

- Η εσωτερική στιβάδα, ή αλλιώς στιβάδα Stern, όπου αντίθετα φορτισμένα ιόντα έχουν δεσμευτεί πάνω στην επιφάνεια του σωματιδίου.
- Η εξωτερική στιβάδα, ή αλλιώς στιβάδα διάχυσης, όπου υπάρχουν θετικά και αρνητικά ιόντα που δέχονται ηλεκτροστατικές δυνάμεις από το επιφανειακό φορτίο των σωματιδίων. Το συνολικό φορτίο της περιοχής αυτής είναι μηδενικό.<sup>18,19</sup>



Εικόνα 15: Αρνητικά φορτισμένο άτομο και οι στιβάδες που δημιουργούνται γύρω από αυτό <sup>19</sup>

Το ζ – δυναμικό ορίζεται ως η διαφορά δυναμικού μεταξύ της ουδέτερης περιοχής του διαλύματος και της φορτισμένης περιοχής στην επιφάνεια των σωματιδίων. Η απόλυτη τιμή του μπορεί να είναι από μηδέν έως και 100 mV και εκφράζει την σταθερότητα των νανοσωματιδίων. Δείγματα με τιμή ζ – δυναμικού από 30mV θεωρούνται σταθερά. Η τιμή του ζ – δυναμικού επηρεάζεται και από το περιβάλλον των νανοσωματιδίων, όπως το pH, η ιονική ισχύς και ο τύπος των ιόντων στο διάλυμα.<sup>18,20</sup>

#### 1.4.2 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία NMR είναι μια μη καταστρεπτική μέθοδος και θεωρείται η πιο σημαντική από τις αναλυτικές μεθόδους για την ταυτοποίηση ενώσεων. Βασίζεται στην απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας χαρακτηριστικής συχνότητας από το δείγμα, με την εφαρμογή μαγνητικού πεδίου. Πιο συγκεκριμένα, κατά την εφαρμογή μαγνητικού πεδίου οι πυρήνες της ένωσης του δείγματος απορροφούν ενέργεια στην περιοχή των ραδιοκυμάτων και μεταβαίνουν από την κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας σε μια κατάσταση υψηλότερης ενέργειας. Αυτό γίνεται με την αναστροφή του spin, μιας θεμελιώδης ιδιότητας κάθε σωματιδίου. Με την αναστροφή αυτή, οι πυρήνες έχουν συντονιστεί με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία.

Στις χημικές ενώσεις, οι συχνότητες στις οποίες συντονίζονται οι πυρήνες ενός στοιχείου μέσα σε ένα μόριο επηρεάζονται και από το περιβάλλον τους, όπως την ηλεκτρονιακή πυκνότητα και τα άτομα με τα οποία συνδέονται.

Η συχνότητα συντονισμού είναι διαφορετική για κάθε στοιχείο, γεγονός που καθιστά την μέθοδο NMR κατάλληλη για την ταυτοποίηση των ενώσεων ενός δείγματος.<sup>22</sup>

## 1.5 Απελευθέρωση φαρμάκου

### 1.5.1 Είδη και μηχανισμοί απελευθέρωσης

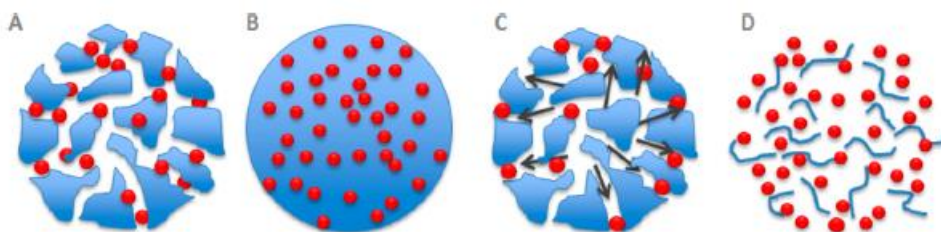
Η απελευθέρωση φαρμάκου αναφέρεται στο πως η φαρμακευτική ουσία απομακρύνεται από την αρχική της θέση μέσα σε ένα σύμπλοκο εγκλεισμού και καταλήγει στον περιβάλλον χώρο με σκοπό ο οργανισμός να την απορροφήσει, κατανέμει, μεταβολίσει και απεκκρίσει (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion - ADME). Η διαλυτοποίηση και απελευθέρωση φαρμάκου είναι ένα πολύ σημαντικό κομμάτι στον σχεδιασμό φαρμακευτικών σκευασμάτων καθώς επηρεάζει άμεσα την δοσολογία της φαρμακευτικής ουσίας.

Μπορούν να επιτευχθούν διάφορα είδη απελευθέρωσης, όπως:

- Άμεση απελευθέρωση, όπου η φαρμακευτική ουσία αποδεσμεύεται και διαλύεται χωρίς καθυστέρηση
- Τροποποιημένη απελευθέρωση, η οποία περιλαμβάνει καθυστερημένη και παρατεταμένη αποδέσμευση της φαρμακευτικής ουσίας
  - Η καθυστερημένη αποδέσμευση αφορά την απελευθέρωση της φαρμακευτικής ουσίας μετά από κάποιο χρονικό διάστημα από την στιγμή της χορήγησης, ενώ η παρατεταμένη αποδέσμευση καθιστά την φαρμακευτική ουσία διαθέσιμη για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την χορήγηση
- Ελεγχόμενη απελευθέρωση, η οποία περιλαμβάνει παρατεταμένη και παλμική απελευθέρωση της φαρμακευτικής ουσίας
  - Η παλμική απελευθέρωση αφορά την απελευθέρωση πεπερασμένων ποσοτήτων φαρμάκου σε ευδιάκριτα χρονικά διαστήματα

Οι βασικοί μηχανισμοί με τους οποίους η φαρμακευτική ουσία μπορεί να απελευθερωθεί από τα πολυμερικά συστήματα είναι:

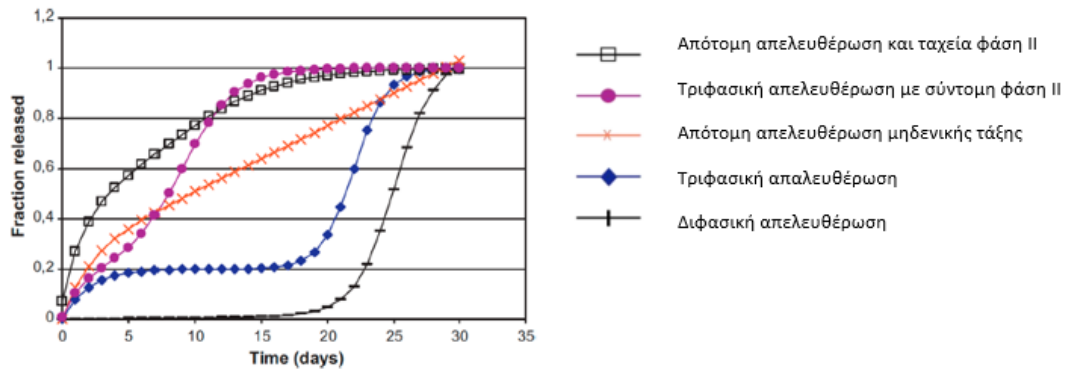
- Διάχυση μέσω πόρων πληρωμένων με νερό
- Διάχυση μέσω της πολυμερικής μήτρας
- Ωσμωτική άντληση της φαρμακευτικής ουσίας
- Διάβρωση της πολυμερικής μήτρας, η οποία οδηγεί σε σχηματισμό πόρων<sup>23,25,26</sup>



Εικόνα 16: Μηχανισμοί απελευθέρωσης φαρμακευτικής ουσίας από πολυμερικά συστήματα: Α) Διάχυση μέσω πληρωμένων πόρων με νερό, Β) Διάχυση μέσω πολυμερικής μήτρας, C) Ωσμωτική άντληση, D) Διάβρωση πολυμερικής μήτρας.<sup>25</sup>

### 1.5.2 Προφίλ απελευθέρωσης

Τα συστήματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης προσφέρουν έλεγχο χρονικής και χωρικής απελευθέρωσης της φαρμακευτικής ουσίας. Το προφίλ απελευθέρωσης μπορεί να λάβει διάφορες μορφές, όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα. Στα πολυμερικά συστήματα, το πιο σύνηθες προφίλ απελευθέρωσης είναι το τριφασικό προφίλ.



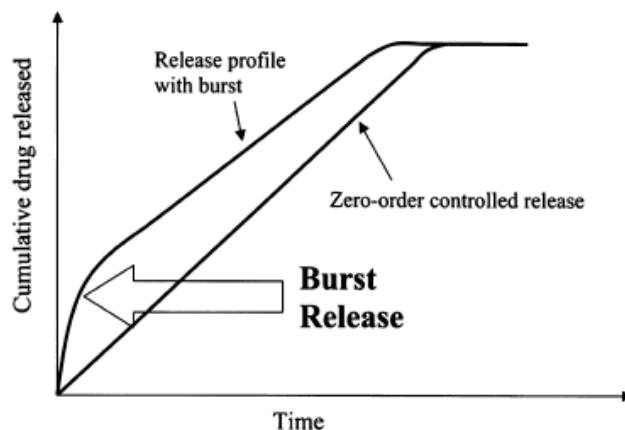
Εικόνα 17: Προφίλ απελευθέρωσης<sup>25</sup>

Η καμπύλη του τριφασικού προφίλ απελευθέρωσης αποτελείται από τις εξής φάσεις:

- Φάση I: αναφέρεται στο φαινόμενο της αρχικής ταχείας απελευθέρωσης «burst effect», όπου η φαρμακευτική ουσία που βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια του πολυμερικού συστήματος και είναι επιφανειακά προσροφημένη, απελευθερώνεται.
- Φάση II: είναι μια φάση βραδείας απελευθέρωσης όπου λαμβάνει χώρα διάχυση της φαρμακευτικής ουσίας μέσω της πολυμερούς μήτρας ή μέσω υπαρχόντων πόρων, ενώ παράλληλα αρχίζει η υδρόλυση και η αποικοδόμηση του πολυμερούς.
- Φάση III: αφορά ταχεία απελευθέρωση που ελέγχεται από τη διάβρωση του πολυμερούς.

Όταν συστήματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης έρχονται σε επαφή με το μέσο απελευθέρωσης και ξεκινάει η διαδικασία της αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας, παρατηρείται μια ραγδαία και σύντομη απελευθέρωση και ακολουθείται από ένα σταθερό προφίλ, το οποίο ονομάζεται «plateau». Η ταχεία αυτή απελευθέρωση είναι γνωστή ως «burst effect».





Εικόνα 18: Burst release effect <sup>25</sup>

Μια τέτοια αρχική απότομη απελευθέρωση της δραστικής ουσίας θα μπορούσε σε ορισμένες περιπτώσεις να είναι επιθυμητή, όμως το φαινόμενο αυτό είναι συνήθως απρόβλεπτο και δύσκολο να ελεγχθεί σε διάρκεια και δοσολογία. Γι'αυτό, η αποφυγή του είναι επιθυμητή έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί πιθανή τοξικότητα που σχετίζεται με υψηλή δόση της ουσίας.

Μερικές από τις πιθανές αιτίες του φαινομένου αυτού είναι οι συνθήκες αποθήκευσης των πολυμερικών συστημάτων, κατά τις οποίες η δραστική ουσία έχει διαχυθεί και αποδεσμεύεται απότομα μόλις η διαδικασία της απελευθέρωσης ξεκινήσει, ετερογενείς πολυμερικές μήτρες και κατασκευαστικά ελαττώματα και διεργασίες ξήρανσης, κατά τις οποίες τα μόρια του νερού μεταφέρουν μέσω μεταγωγής μόρια της δραστικής ουσίας προς την επιφάνεια του φορέα. <sup>25</sup>

### 1.5.3 Κινητικά μοντέλα απελευθέρωσης

Η μαθηματική μοντελοποίηση της απελευθέρωσης φαρμάκων είναι αρκετά σημαντική και χρήσιμη καθώς δίνει πληροφορίες και προβλέπει την κινητική της απελευθέρωσης πριν την έναρξη της διαδικασίας. Επίσης, έχει την δυνατότητα να υπολογίσει ορισμένες σημαντικές φυσικές παραμέτρους, όπως τον συντελεστή διάχυσης και είναι αναπόσπαστο κομμάτι στην ανάπτυξη και βελτιστοποίηση προϊόντων, καθώς συνεισφέρει στην κατανόηση του φαινομένου της απελευθέρωσης εγκλεισμένων φαρμακευτικών ουσιών.

Τα κυριότερα κινητικά μοντέλα απελευθέρωσης είναι:

- Μοντέλο απελευθέρωσης μηδενικής τάξης (zero order)
- Μοντέλο απελευθέρωσης πρώτης τάξης (first order)
- Μοντέλο Higuchi
- Μοντέλο Korsmeyer – Peppas
- Μοντέλο Hixson – Crowell
- Μοντέλο Weibull

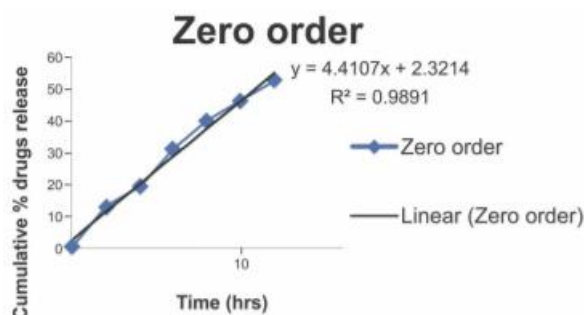
### **Μοντέλο απελευθέρωσης μηδενικής τάξης (zero order)**

Το μοντέλο μηδενικής τάξης αναφέρεται στην διαρκή απελευθέρωση της φαρμακευτικής ουσίας ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης και εκφράζεται από την εξίσωση:

$$Q = Q_0 + K_0 \cdot t$$

όπου Q η ποσότητα της δραστικής ουσίας που απελευθερώνεται την χρονική στιγμή t, Q<sub>0</sub> η αρχική ποσότητα της δραστικής ουσίας στο διάλυμα (συνήθως λαμβάνεται ίση με μηδέν) και K<sub>0</sub> η σταθερά απελευθέρωσης μηδενικής τάξης.

Το μοντέλο μηδενικής τάξης αποτυπώνεται γραφικά με το διάγραμμα της ποσότητας % της απελευθερωμένης δραστικής ουσίας συναρτήσει χρόνου.



Εικόνα 19: Παράδειγμα διαγράμματος ενός μοντέλου απελευθέρωσης μηδενικής τάξης <sup>27</sup>

Αυτό το μοντέλο παρατηρείται κυρίως σε συστήματα απελευθέρωσης που πραγματοποιούνται με ώσμωση, σε ορισμένα διαδερμικά συστήματα και σε επικαλυμμένα δισκία όπου η δραστική ουσία έχει χαμηλή διαλυτότητα.

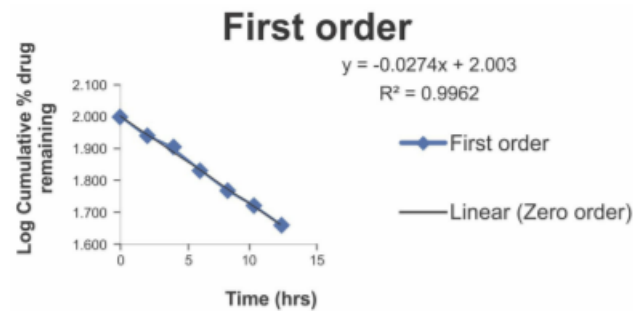
### **Μοντέλο απελευθέρωσης πρώτης τάξης (first order)**

Το μοντέλο απελευθέρωσης πρώτης τάξης περιγράφει την απελευθέρωση της δραστικής ουσίας, όπου ο ρυθμός της είναι εξαρτούμενος από την συγκέντρωση της και εκφράζεται από την εξίσωση:

$$\log Q = \log Q_0 - \frac{k \cdot t}{2.303}$$

όπου Q η ποσότητα της δραστικής ουσίας στο διάλυμα την χρονική στιγμή t, Q<sub>0</sub> η αρχική ποσότητα της δραστικής ουσίας και k η σταθερά απελευθέρωσης πρώτης τάξης.

Το μοντέλο πρώτης τάξης αποτυπώνεται γραφικά με το διάγραμμα του λογαρίθμου της ποσότητας % της ουσίας συναρτήσει του χρόνου.



Εικόνα 20: Παράδειγμα διαγράμματος ενός μοντέλου απελευθέρωσης πρώτης τάξης <sup>27</sup>

Αυτό το μοντέλο παρατηρείται για συστήματα που περιέχουν υδατοδιαλυτή δραστική ουσία και πορώδη μήτρα.

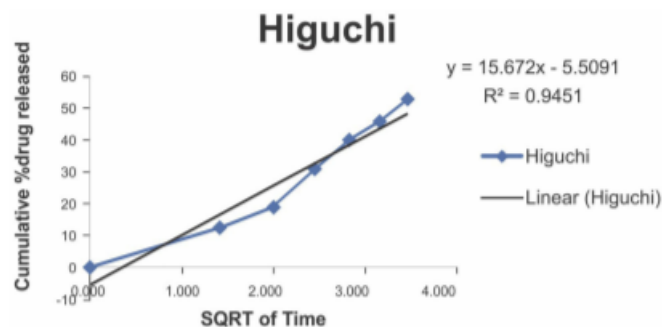
### Μοντέλο Higuchi

Αποτελεί το πρώτο μοντέλο που αναπτύχθηκε με σκοπό να περιγράψει την απελευθέρωση δραστικής ουσίας από έναν φορέα με διάχυση βασιζόμενη στον πρώτο νόμο του Fick. Εκφράζεται από την εξίσωση:

$$Q = KH \cdot t^{1/2} \quad (I)$$

όπου Q η ποσότητα της δραστικής ουσίας που απελευθερώθηκε σε χρόνο t και KH η σταθερά Higuchi.

Το μοντέλο Higuchi αποτυπώνεται γραφικά με διάγραμμα της ποσότητας % της απελευθερωμένης δραστικής ουσίας συναρτήσει το τετράγωνο του χρόνου.



Εικόνα 21: Παράδειγμα διαγράμματος ενός μοντέλου απελευθέρωσης Higuchi <sup>27</sup>

Για την χρήση, όμως, της εξίσωσης (I) πρέπει να πληρούνται οι εξής παραδοχές:

1. Η αρχική συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στον φορέα είναι μεγαλύτερη από την διαλυτότητα της
2. Η διάχυση της ουσίας δεν έχει κατεύθυνση
3. Το πάχος του συστήματος είναι πολύ μεγαλύτερο από το μέγεθος των μορίων της δραστικής ουσίας
4. Η διόγκωση και η διαλυτότητα του φορέα είναι αμελητέα
5. Η δραστική ουσία διαχέεται με σταθερό ρυθμό

6. Επικρατούν τέλειες συνθήκες βύθισης στο περιβάλλον όπου πραγματοποιείται η απελευθέρωση

### **Μοντέλο Korsmeyer – Peppas**

Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, η εμπειρική εξίσωση που εκφράζει την απελευθέρωση της δραστικής ουσίας είναι:

$$M_t/M = K \cdot t^n \quad (III)$$

όπου  $M_t$  η ποσότητα της δραστικής ουσίας που απελευθερώνεται την χρονική στιγμή  $t$ ,  $M$  η συνολική ποσότητα της ουσίας στην ισορροπία,  $K$  η κινητική σταθερά που ενσωματώνει δομικά και γεωμετρικά χαρακτηριστικά του συστήματος απελευθέρωσης και  $n$  ο εκθέτης απελευθέρωσης, ενδεικτικός του μηχανισμού μεταφοράς της δραστικής ουσίας μέσω του πολυμερικού συστήματος.

Έτσι, η τιμή του εκθέτη  $n$  χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό του μηχανισμού απελευθέρωσης.

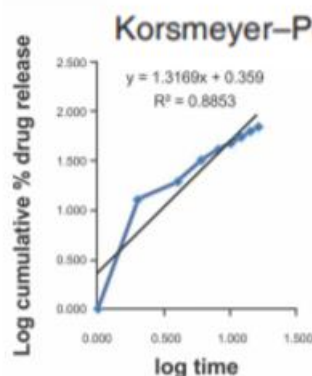
Για  $n = 0.5$  έχουμε Fickian διάχυση, όπου κυριαρχούν τα φαινόμενα διάχυσης και ο ρυθμός διάχυσης καθορίζει την κινητική αυτών των συστημάτων.

Για  $0.5 < n < 1$  έχουμε μη-Fickian ή ανώμαλη μεταφορά, όπου τα φαινόμενα διάχυσης και διόγκωσης είναι ισοδύναμα.

Για  $n = 1$  έχουμε μη Fickian - Case II μηχανισμό, όπου η κινητική του είναι μηδενικής τάξης και τα φαινόμενα που επικρατούν είναι η διόγκωση του πολυμερικού συστήματος.

Για  $n > 1$  έχουμε Super Case II μηχανισμό, όπου συμβαίνει χαλάρωση και διάβρωση του πολυμερικού συστήματος.

Το μοντέλο Korsmeyer – Peppas απεικονίζεται γραφικά με διάγραμμα του λογαρίθμου του κλάσματος της ποσότητας % της δραστικής ουσίας που απελευθερώνεται την χρονική στιγμή  $t$  συναρτήσει του λογαρίθμου του χρόνου.



Εικόνα 22: Παράδειγμα διαγράμματος ενός μοντέλου απελευθέρωσης Korsmeyer – Peppas <sup>27</sup>

Η εξίσωση (III) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση του πρώτου 60% των πειραματικών δεδομένων απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας. <sup>24,26</sup>

## 1.6 Αλληλεπίδραση ενώσεων με το DNA

### 1.6.1 Τρόποι αλληλεπίδρασης ενώσεων με το DNA

Το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) μεταφέρει γενετικές πληροφορίες και καθοδηγεί την βιολογική σύνθεση πρωτεϊνών και ενζύμων μέσω της αντιγραφής και μεταγραφής των πληροφοριών αυτών σε ζωντανά κύτταρα. Γι'αυτό τον λόγο, οι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης μικρών μορίων με το DNA αποτελεί αντικείμενο έρευνας για την θεραπεία γενετικών ασθενειών όπως ο καρκίνος.

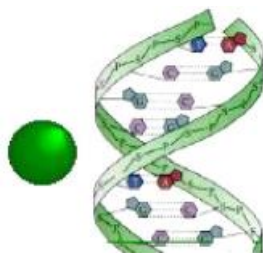
Τα αντικαρκινικά φάρμακα αλληλεπιδρούν με το DNA με κυρίως τρεις διαφορετικούς τρόπους. Ο πρώτος τρόπος είναι μέσω ελέγχου των μεταγραφικών παραγόντων και των πολυμερασών. Ο δεύτερος αφορά την σύνδεση RNA είτε στην διπλή έλικα του DNA, σχηματίζοντας έτσι δομές τριπλής έλικας νουκλεϊκού οξέος, είτε σε εκτεθειμένη μονόκλινη έλικα DNA που οδηγεί σε σχηματισμό υβριδίων DNA – RNA. Ο τρίτος τρόπος περιλαμβάνει την απευθείας σύνδεση μικρών αρωματικών μορίων προσδέματος σε δομές διπλής έλικας.

Ειδικότερα, οι μηχανισμοί για τον τρίτο τρόπο αλληλεπίδρασης διακρίνονται σε:

- Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση του μορίου με το αρνητικά φορτισμένο άκρο του DNA
- Παρεμβολή του μορίου μεταξύ ζευγών αζωτούχων βάσεων του DNA
- Αλληλεπιδράσεις στην μικρή ή μεγάλη αύλακα του DNA<sup>28</sup>

#### **Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις**

Μερικά μόρια είναι ικανά να σχηματίσουν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τις φωσφορικές ομάδες που βρίσκονται στο άκρο του DNA, το οποίο είναι αρνητικά φορτισμένο. Τα μόρια αυτά είναι συνήθως θετικά φορτισμένα ιόντα ή μέταλλα και προσδέονται στο DNA με σκοπό την μείωση των απωστικών δυνάμεων μεταξύ των ιόντων τους δημιουργώντας συσσωματώματα.<sup>31</sup>



Εικόνα 23: Δέσμευση ιόντος στο DNA μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων<sup>31</sup>

#### **Παρεμβολή (Intercalation)**

Η παρεμβολή είναι μια μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση, όπου ένα μικρό επίπεδο αρωματικό μόριο παρεμβάλεται μεταξύ των γειτονικών βάσεων του DNA. Τα μόρια αυτά συνδέονται με το DNA μέσω επικάλυψης των π-ηλεκτρονίων τους και σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου και Van der Waals. Η αλληλεπίδραση αυτή προκαλεί κάποιες

δομικές αλλαγές στο DNA, όπως σταθεροποίηση, τοπική χαλάρωση και επιμήκυνση. Οι αλλαγές αυτές συμβάλλουν στην αναστολή της διαδικασίας αντιγραφής και μεταγραφής του DNA και έτσι εμποδίζεται η κυτταρική διαίρεση και ανάπτυξη. Γι'αυτόν τον λόγο, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την πιθανή χρήση τους σε αντικαρκινικά φάρμακα.<sup>30</sup>

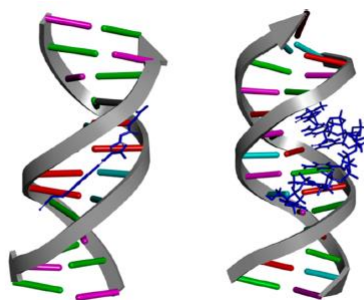


Εικόνα 24: 3D απεικόνιση παρεμβολής μορίου στο DNA<sup>30</sup>

### **Δέσμευση στην μικρή ή στην μεγάλη αύλακα (*Minor/major groove binding*)**

Η διπλή έλικα του DNA σχηματίζει δύο διαφορετικές αυλακώσεις, την μεγάλη και την μικρή αύλακα. Οι αύλακες αυτές διαφέρουν στο μέγεθος τους, με την μεγάλη αύλακα να είναι ευρύτερη και βαθύτερη. Συνεπώς, στην μεγάλη αύλακα προσδέονται πρωτεΐνες και μεγάλα μόρια (όπως ολιγονουκλεοτίδια), ενώ μικρά μόρια μπορούν να δεσμευτούν και στις δύο αύλακες. Τα μικρά αυτά μόρια διαθέτουν ή υιοθετούν επίπεδο σχήμα ημισελήνου, το οποίο τους επιτρέπει την τοποθέτησή τους στην αύλακα με το μικρότερο δυνατό στερικό εμπόδιο. Γι'αυτόν τον λόγο, προτιμούν την δέσμευσή τους στην μικρή αύλακα, όπου έχουν την καλύτερη εφαρμογή. Επιπλέον, η δέσμευση παρατηρείται στις περιοχές πλούσιες με αδερίνη και θυμίνη (περιοχές AT), καθώς είναι πιο στενές και ελαφρώς βαθύτερες από τις περιοχές πλούσιες σε κυτοσίνη και γουανίνη (περιοχές CG). Οι δυνάμεις που αναπτύσσονται κατά την δέσμευση μορίων στις αύλακες του DNA είναι Van der Waals.

Η δέσμευση μορίου σε αύλακα δεν προκαλεί δομικές αλλαγές στο DNA και μπορεί να θεωρηθεί παρόμοια με μοντέλο “κλειδιού – κλειδαριάς”. Όμως, παρεμβαίνει στην αλληλεπίδραση του DNA με τις πρωτεΐνες δέσμευσης του, όπως είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες και οι πρωτεΐνες επιδιόρθωσης. Γι'αυτόν τον λόγο, τέτοια μόρια χρησιμοποιούνται κλινικά για αντικαρκινικές και αντιβακτηριακές θεραπείες.<sup>29,30</sup>



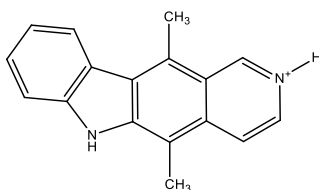
Εικόνα 25: Αριστερά: Απεικόνιση δέσμευσης μορίου στην μικρή αύλακα του DNA. Δεξιά: Απεικόνιση δέσμευσης μορίου στην μεγάλη αύλακα του DNA<sup>30</sup>

## 1.6.2 Αλληλεπίδραση οργανικών ενώσεων με το DNA

Παρακάτω αναφέρονται διάφορες οργανικές ενώσεις που αλληλεπιδρούν με την έλικα του DNA. Τέτοιες ενώσεις χρησιμοποιούνται ευρέως στην φαρμακευτική χημεία λόγω της ικανότητάς τους να εμποδίζουν και να διακόπτουν την λειτουργία πρωτεϊνών όπως πολυμεράσες, μεταγραφικούς παράγοντες, συστήματα επιδιόρθωσης DNA και τοποϊσομεράσες.

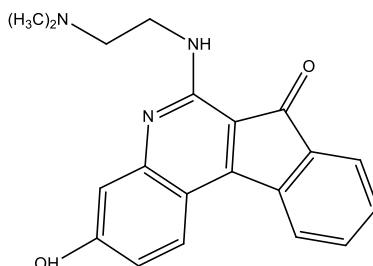
### **Οργανικές ενώσεις που αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω παρεμβολής (intercalators)**

Το Ellipticine είναι ένα αλκαλοειδές που απομονώνεται από τα φύλλα της *Ochrosia elliptica* και άλλων φυτών *Arocynaceae*, είναι το πρωτότυπο των παρεμβολών που βασίζονται στο σύστημα της πυριδοκαρβαζόλης και εμφανίζει ένα ευρύ φάσμα αντικαρκινικής δραστηριότητας. Σε φυσιολογικό pH υπάρχει στην ουδέτερη και στην πρωτονιωμένη του μορφή, με την δεύτερη να είναι υπεύθυνη για την παρεμβολή του μορίου στο DNA που οδηγεί στην αναστολή της RNA πολυμεράσης.



Εικόνα 26: Πρωτονιωμένη μορφή του ellipticine <sup>32</sup>

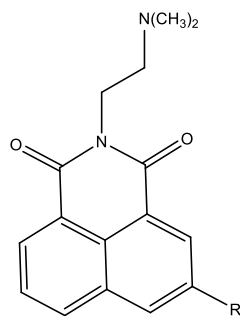
Η οργανική ένωση TAS-103 αλληλεπιδράει με το DNA και αναστέλλει την λειτουργία της τοποϊσομεράσης I και II. Είναι αξιοσημείωτα αποτελεσματική έναντι διαφόρων μεταστατικών καρκίνων του πνεύμονα, ενώ χρησιμοποιείται σε κλινικές δοκιμές για την θεραπεία στερεών όγκων.



Εικόνα 27: TAS-103 <sup>32</sup>

Επίσης, παράγωγα της ένωσης Naphthalimide που φέρουν μια πλευρική αλυσίδα αμινοαλκυλίου, όπως το Mitonafide και το Amonafide, έχουν δείξει κυτταροτοξική δράση.

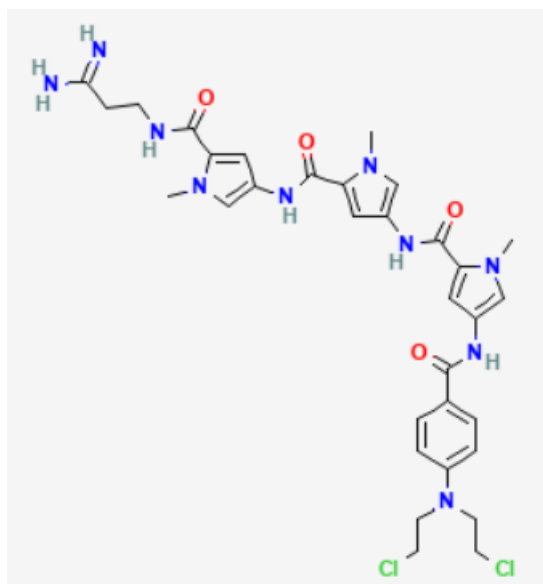
Αυτή η δράση οφείλεται στην αλληλεπίδρασή τους με το DNA και στην αναστολή της τοποϊσομεράσης II.<sup>32</sup>



Εικόνα 28: Mitonafide:  $R=\text{NO}_2$ , Amonafide:  $R=\text{NH}_2$ <sup>32</sup>

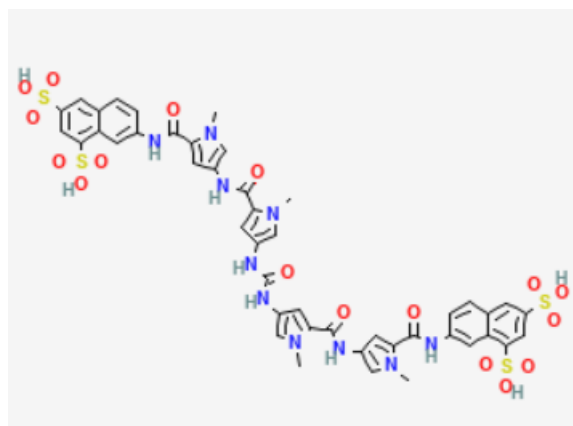
### **Οργανικές ενώσεις που αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω δέσμευσης στην μικρή αύλακα (minor groove binders)**

Το αντιβιοτικό Distamycin A δεν έχει αντικαρκινικές ιδιότητες στην μη τροποποιημένη του μορφή, όμως έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη διάφορων νέων φαρμάκων που δεσμεύονται στο DNA και εμφανίζουν φαρμακευτικές ιδιότητες. Τέτοια παράγωγα είναι το Tallimustine, το οποίο εμφανίζει αντικαρκινική δραστηριότητα και η φαρμακευτική ένωση PNU-145156E, η οποία πιστεύεται ότι είναι αντιαλλεργιογόνο και συνεργιστικό με άλλα κυτταροτοξικά φάρμακα.<sup>33</sup>



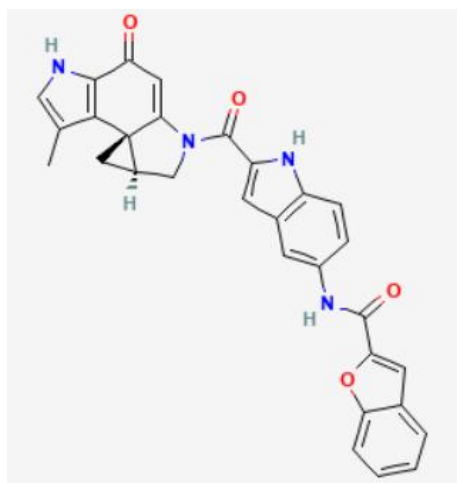
Εικόνα 29: Tallimustine<sup>33</sup>



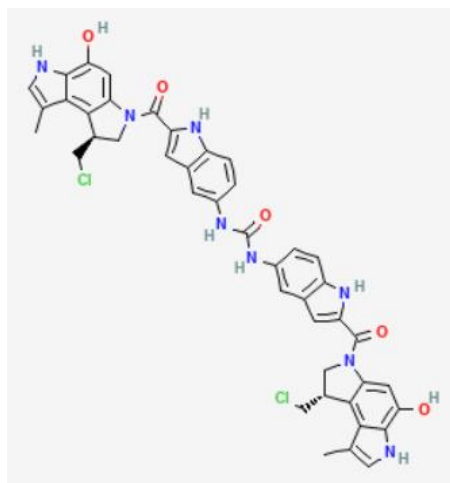


Εικόνα 30: PNU-145156E<sup>33</sup>

Προερχόμενο από τον μικροοργανισμό *Streptomyces zelensis* το 1978, η ένωση CC-1065 έδειξε εξαιρετική *in vitro* αντικαρκινική δράση. Όμως, οι πρώτες προκλινικές μελέτες έδειξαν ότι το CC-1065 προκάλεσε καθυστερημένη ηπατοτοξικότητα σε ποντίκια και κουνέλια. Παρόλα αυτά, η ένωση αυτή αποτέλεσε πρότυπο για την σύνθεση διάφορων συνθετικών φαρμάκων, όπως το Adozelesin. Το Adozelesin διατήρησε την αντικαρκινική δράση του CC-1065 χωρίς να εμφανίζει την ηπατοτοξικότητα της φυσικής ένωσης. Έρευνες έδειξαν ότι η αντικαρκινική δράση του CC-1065 είναι αποτέλεσμα της αναστολής της DNA πολυμεράσης λόγω δέσμευσης της ένωσης στην μικρή αύλακα του DNA. Άλλο ένα παράγωγο της ένωσης CC-1065 είναι το Bizelesin, το οποίο σε προκλινικές μελέτες σε ποντίκια έδειξε σημαντική θεραπευτική δράση σε μια μεγάλη ποικιλία τύπων όγκων, όπως των νεφρών, των πνευμόνων, του παχέος εντέρου, του μαστού και του μελανώματος.<sup>33</sup>



Εικόνα 31: Adozelesin<sup>33</sup>

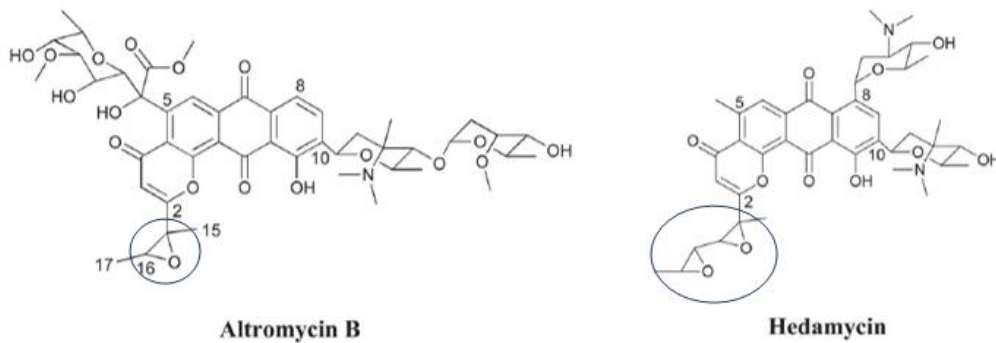


Εικόνα 32: Bizelesin<sup>33</sup>

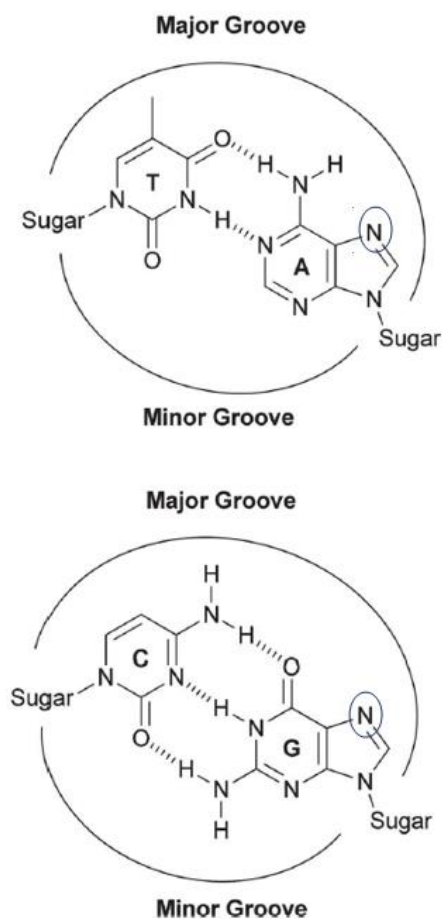
### **Οργανικές ενώσεις που αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω δέσμευσης στην μεγάλη αύλακα (major groove binders)**

Η κατηγορία αντικαρκινικών αντιβιοτικών Pluramycin είναι γνωστή στην επιστημονική κοινότητα για την βιολογική της δράση. Σημαντικά μόρια αυτής της κατηγορίας είναι το Altromycin B και το Hedamycin. Τα μόρια αυτά δεσμεύονται στην μεγάλη αύλακα του DNA

και όπως παρατηρήθηκε, γίνεται αλκυλίωση της θέσης N7 της πουρίνης όταν πλησιάσουν οι εποξειδικοί δακτύλιοι των μορίων.<sup>34</sup>

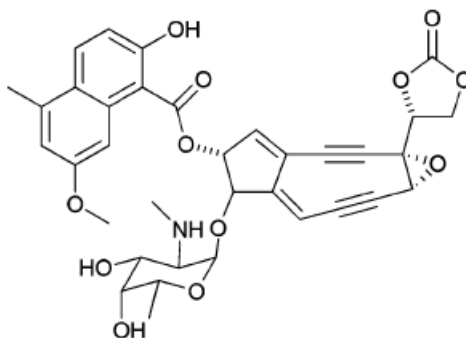


Εικόνα 33: Altromycin B και Hedamycin με τους εποξειδικούς δακτυλίους τους<sup>34</sup>



Εικόνα 34: Οι έλικες του DNA με κυκλωμένα τα άζωτα στην θέση 7 της πουρίνης<sup>34</sup>

Ένα ακόμα φαρμακευτικό μόριο, το οποίο δεσμεύεται στην μεγάλη αύλακα του DNA είναι το Neocarzinostatin. Απομονώθηκε αρχικά από μια πρωτεΐνη και ανήκει στην κατηγορία των αντικαρκινικών αντιβιοτικών ενεδίνης (enediynes).<sup>34</sup>



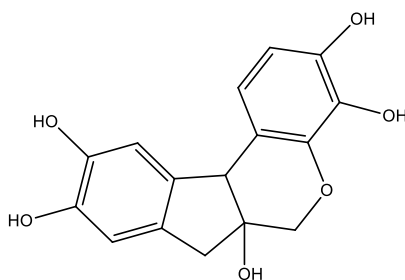
Εικόνα 35: Neocarzinostatin <sup>34</sup>

### 1.6.3 Αλληλεπίδραση κυκλοδεξτρινών με το DNA - Εφαρμογές

Όταν το φιλοξενούμενο μόριο σε ένα σύμπλοκο εγκλεισμού αλληλεπιδρά με το DNA, η παρουσία του φορέα, δηλαδή της κυκλοδεξτρίνης, επηρεάζει την αλληλεπίδραση αυτή. Παρακάτω αναφέρονται παραδείγματα εφαρμογής της κυκλοδεξτρίνης ως φορέα συμπλόκου και πως το σύμπλοκο αυτό αλληλεπιδρά με το DNA.

#### **Σύμπλοκο εγκλεισμού της αιματοξυλίνης με φορέα την β-CD**

Ως φιλοξενούμενο μόριο σε αυτήν την εφαρμογή είναι η αιματοξυλίνη (hematoxylin, HE), η οποία είναι βιολογική χρωστική που μπορεί να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου με τα ζεύγη βάσεων του DNA. Η παρουσία των αρωματικών δακτυλίων κατευθύνει τόσο την αλληλεπίδραση της ένωσης με το DNA, όσο και για τον εγκλεισμό της στην κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης.



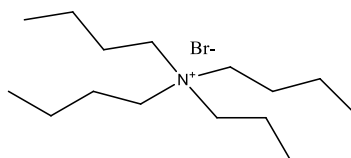
Εικόνα 36: Hematoxylin <sup>35</sup>

Μέσω μελετών στα φάσματα απορρόφησης, βρέθηκε ότι το υδρόφοβο περιβάλλον της β-CD άλλαξε την αλληλεπίδραση της HE και του DNA. Έχει βρεθεί ότι η ένωση HE αλληλεπιδρά με το DNA μέσω παρεμβολής. Όμως, στην περίπτωση εγκλεισμού της σε β-CD, ο τρόπος

αλληλεπίδρασης του συμπλόκου μετατρέπεται σε αλληλεπίδραση μέσω παρεμβολής και ηλεκτροστατικών δυνάμεων.<sup>35</sup>

### **Σύμπλοκο εγκλεισμού του βρωμιούχου τετραβουτυλαμμωνίου με φορέα την β-CD**

Το βρωμιούχο τετραβουτυλαμμώνιο (TBAB) χρησιμοποιείται στον καθαρισμό πλεγμών, ενώ έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην φαρμακευτική σύνθεση αντιμυκητιασικού φαρμάκου.

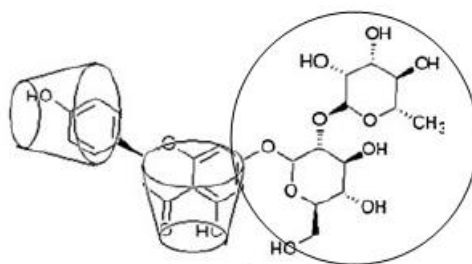


Εικόνα 37: TBAB<sup>36</sup>

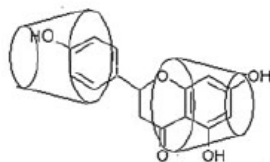
Κατά την τιτλοδότηση υπεριώδους – ορατού (UV-Vis) παρατηρήθηκε υπερχρωμία (hyperchromism), γεγονός που υποδηλώνει εξωτερική επαφή ηλεκτροστατικής φύσεως μεταξύ της ένωσης και του DNA. Το TBAB αλληλεπιδράει με το DNA μέσω μη ειδικών, εξωτερικών, ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τις φωσφορικές ομάδες που βρίσκονται στο άκρο του DNA.<sup>36</sup>

### **Σύμπλοκα εγκλεισμού ναρινγκίνης και ναρινγκενίνης με φορέα την β-CD**

Η ναρινγκίνη και η ναρινγκενίνη είναι βιοδραστικές ενώσεις που υπάρχουν σε σημαντικές ποσότητες σε φυτά. Η ναρινγκίνη είναι ένας από τους λόγους της οξειδωτικής δράσης των εσπεροειδών και μεταβολίζεται στην ναρινγκενίνη, η οποία έχει αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση. Γι'αυτό ο εγκλεισμός αυτών των ενώσεων σε συστήματα κυκλοδεξτρίνης είναι σημαντικός, καθώς αυξάνει την υδατοδιαλυτότητα και την βιοδιαθεσιμότητα τους.



Εικόνα 38: Σύμπλοκο εγκλεισμού ναρινγκίνης/β-CD με αναλογία 1:2<sup>37</sup>



Εικόνα 39: Σύμπλοκο εγκλεισμού ναρινγκενίνης/ $\beta$ -CD με αναλογία 1:2 <sup>37</sup>

Αναφορικά με την ναρινγκίνη, παρατηρήθηκε ότι ο εγκλεισμός της επηρέασε την αλληλεπίδραση της με το DNA. Πιο συγκεκριμένα, το σύμπλοκο Nariη- $\beta$ -CD δεν έχει μεγάλη αλληλεπίδραση με το ct-DNA προς σχηματισμό ενός συμπλόκου τριών συστατικών. Το τμήμα νεοεσπεριδοσίδης (neohesperidoside), το οποίο φαίνεται κυκλωμένο στην Εικόνα 38, εμπλέκεται σε ισχυρότερη αλληλεπίδραση με την  $\beta$ -CD, εμποδίζοντας έτσι την διαθεσιμότητα της ναρινγκίνης να αλληλεπιδράσει με το DNA.

Αντιθέτως, παρατηρήθηκε ότι ο εγκλεισμός της ναρινγκενίνης δεν επηρέασε την αλληλεπίδρασή της με το ct-DNA. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην απουσία του τμήματος νεοεσπεριδοσίδης (neohesperidoside). <sup>37</sup>

## 2. Πειραματικό Μέρος

### 2.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η παρασκευή και ο χαρακτηρισμός συμπλόκων εγκλεισμού της 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτροκιναζολιν-4(3H)-όνης σε β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD), μεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (Me-β-CD) και 2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD) και η μελέτη της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων αυτών με το ct-DNA, τόσο μέσω υπολογιστικής μεθόδου όσο και με *in vitro* πειράματα μέσω τιτλοδότησης UV-Vis.

Τα μόρια που φέρουν το σύστημα δακτυλίων της κινάζολινόνης παρουσιάζουν μεγάλο εύρος βιολογικών ιδιοτήτων, όπως αντικαρκινικές, αντιυπερτασικές, αντιβακτηριακές, αναλγητικές. Η 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτροκιναζολιν-4(3H)-όνη επιλέχθηκε ως το φιλοξενούμενο μόριο (guest molecule) σε συστήματα εγκλεισμού με φορέα τις β-κυκλοδεξτρίνες (β-CD, Me-β-CD, HP-β-CD) γιατί έχει συντεθεί και μελετηθεί από την ερευνητική ομάδα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας ως προς την ικανότητά της να αλληλεπιδρά με το ct-DNA και επέδειξε πολύ αξιόλογη δράση. Η διαδικασία του εγκλεισμού θα βελτιώσει την υδατοδιαλυτότητα, την σταθερότητα και την βιοδιαθεσιμότητα της δραστικής ουσίας.

Τα σύμπλοκα εγκλεισμού παρασκευάζονται με δύο μεθόδους: την μέθοδο της υγρής λειοτρίβησης (kneading) και την συνδυαστική μέθοδο εξάτμισης διαλύτη και λυοφιλοποίησης (solvent evaporation & freeze drying).

Στην συνέχεια, ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός τους. Πιο συγκεκριμένα, υπολογίζεται η απόδοση διεργασίας και η απόδοση εγκλεισμού κάθε συμπλόκου μέσω φασματοφωτομετρίας υπεριώδους-ορατού (UV-Vis). Προσδιορίζεται το μέγεθος, ο δείκτης πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό μέσω δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS), ενώ ο προσδιορισμός της δομής των ενώσεων και η ταυτοποίηση τους πραγματοποιείται με την φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και την φασματομετρία υπέρυθρου (FT-IR).

Επιπρόσθετα, πραγματοποιείται μελέτη απελευθέρωσης της κινάζολινόνης από τα σύμπλοκα εγκλεισμού σε συνθήκες pH=7.4 και θερμοκρασία 37°C και προσδιορίζεται το κινητικό μοντέλο της απελευθέρωσης.

Τέλος, μελετάται η αλληλεπίδραση των συμπλόκων εγκλεισμού με το DNA, τόσο πειραματικά με χρήση της φασματοφωτομετρίας UV-Vis, όσο και υπολογιστικά με προγράμματα. Αξιολογούνται τα αποτελέσματα και προσδιορίζεται ο τρόπος αλληλεπίδρασης (ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση, παρεμβολή, δέσμευση στην μικρή ή μεγάλη αύλακα).

## 2.2 Όργανα – Συσκευές

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια του πειραματικού μέρους είναι τα εξής:

- Ζυγός ακριβείας (μέχρι 210g) ADB 200-4 Kern
- Ζυγός ακριβείας (μέχρι 2g) M2P Satorius
- Λουτρό υπερήχων 2210 Ultrasonic Bath Branson
- Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενο μάτι MSH-20A Witeg
- Αναδευτήρας Vortex V05 Ibx Instruments
- Πεχάμετρο 744 Metrohm
- Επωαστήρας Gallenkamp
- Λυοφιλοποιητής 46/1 Lablyo Mini
- Φυγόκεντρος LYNX 6000 Sorvall
- Φασματόμετρο FT-IR 4200 Jasco
- Φασματόμετρο NMR V600MHz Varian
- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis V-770 Jasco
- Όργανο μέτρησης δυναμικής σκέδασης φωτός DLS Zetasizer Nano ZS

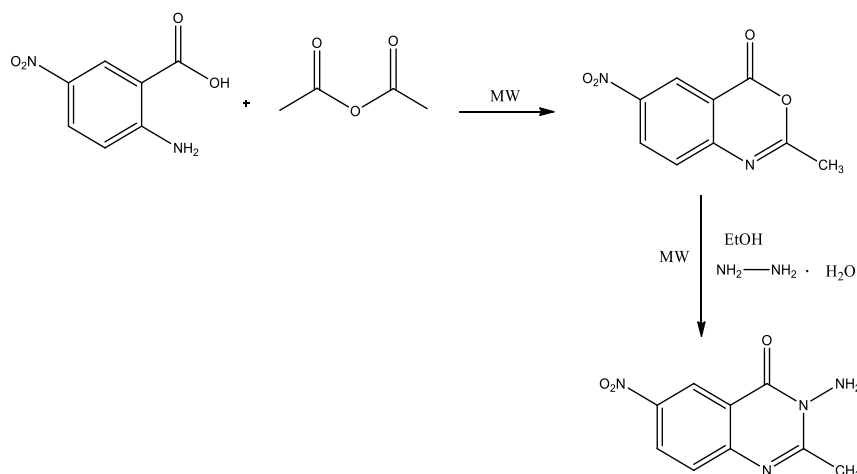
## 2.3 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή και μελέτη των συμπλόκων εγκλεισμού είναι τα εξής:

- β-κυκλοδεξτρίνη (beta-cyclodextrin) με MW 1134.98 g/mol, η οποία αγοράστηκε από την εταιρία Glentham Life Sciences
- Μεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (methyl-beta-cyclodextrin) με MW 1310 g/mol, η οποία αγοράστηκε από την εταιρία Glentham Life Sciences
- 2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (hydroxypropyl-beta-cyclodextrin) με MW 1460 g/mol, η οποία αγοράστηκε από την εταιρία Acros Organics
- Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ, sodium salt calf thymus 100mg (ct-DNA), το οποίο αγοράστηκε από την εταιρία Alfa Aesar
- Αιθανόλη 99.8% από την εταιρία Acros Organics
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), το οποίο αγοράστηκε από την εταιρία Fisher Chemical
- Όξινο φωσφορικό κάλιο ( $K_2HPO_4$ ) και δισόξινο φωσφορικό κάλιο ( $KH_2PO_4$ ), τα οποία αγοράστηκαν από την εταιρία Penta
- Methyl Green (C.I. 42585) 5g από την εταιρία Glentham Life Sciences

## 2.4 Μεθοδολογία σύνθεσης 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτροκιναζολιν-4(3H)-όνης

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, η ένωση της κιναζολινόνης λήφθηκε έτοιμη από προηγούμενη πειραματική διαδικασία. Παρόλα αυτά, αναφέρεται η μεθοδολογία σύνθεσής της.



Εικόνα 40: Μεθοδολογία σύνθεσης 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτροκιναζολιν-4(3H)-όνη

Σε πρώτο στάδιο, σε κατάλληλο γυάλινο σωλήνα που χρησιμοποιείται στη μικροκυματική ακτινοβολία εισάγεται το αντίστοιχο ανθρανιλικό οξύ και 5 mL οξικού ανυδρίτη για κάθε αντίδραση. Ακολουθείται η μέθοδος ακτινοβόλησης. Οι συνθήκες εκτέλεσης του πειράματος είναι: 250W, 120°C για 22 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση. Το δείγμα που παραλαμβάνεται ψύχεται για περίπου 30 λεπτά και ακολουθείται διήθηση και έκπλυση με πετρελαϊκό αιθέρα. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται αρχικά με την ανάλυση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας 40% και πετρελαϊκός αιθέρας 60%).

Σε δεύτερο στάδιο, σε αντίστοιχο γυάλινο σωλήνα κατάλληλο για μικροκυματική ακτινοβολία εισάγεται η 6-νιτρο-βενζοξαζινόνη (το προϊόν του πρώτου σταδίου), η κατάλληλη ποσότητα ένυδρης υδραζίνης και 5 mL αιθανόλης για κάθε αντίδραση. Ακολουθείται η μέθοδος ακτινοβόλησης. Οι συνθήκες εκτέλεσης του πειράματος είναι: 250W, 120°C για 20 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση. Το δείγμα που παραλαμβάνεται ψύχεται για περίπου 30 λεπτά και ακολουθείται διήθηση και έκπλυση με παγωμένη αιθανόλη. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται αρχικά με την ανάλυση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας 80% και πετρελαϊκός αιθέρας 20%). Τέλος, ακολουθείται ανακρυστάλλωση και ταυτοποίηση της ένωσης.<sup>1</sup>



## 2.5 Παρασκευή συμπλόκων εγκλεισμού β-CD-κιναζολινόνης

Η ουσία 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτρο-κιναζολιν-4(3H)-όνη εγκλείστηκε στην φυσική β-κυκλοδεξτρίνη, καθώς και σε δύο υποκατεστημένες β-κυκλοδεξτρίνες, την μεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (Me-β-CD) και την 2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD). Οι παραπάνω εγκλεισμοί πραγματοποιήθηκαν για δύο διαφορετικές αναλογίες, κιναζολινόνη/κυκλοδεξτρίνη 2:1 και 1:1.

Πίνακας 3: Αναλογίες κιναζολινόνης/κυκλοδεξτρίνης για τα σύμπλοκα εγκλεισμού που παρασκευάστηκαν

	β-CD	Me-β-CD	HP-β-CD
Κιναζολινόνη	2:1	2:1	2:1
	1:1	1:1	1:1

Οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν για την δημιουργία συμπλόκων εγκλεισμού είναι η υγρή λειοτρίβηση με σχηματισμό πάστας (μέθοδος kneading) και η συνδυαστική μέθοδος εξάτμισης διαλύτη και λυοφιλοποίησης (solvent evaporation & freeze drying).

### 2.5.1 Παρασκευή συμπλόκων εγκλεισμού μέσω υγρής λειοτρίβησης με σχηματισμό πάστας (Μέθοδος Kneading)

Κατά αυτήν την μέθοδο, προστίθενται σε ιγδίο ποσότητα κυκλοδεξτρίνης, ανάλογη ποσότητα κιναζολινόνης και μερικές σταγόνες διαλύτη νερού/αιθανόλης (7:3 v/v). Η λειοτρίβηση διαρκεί για περίπου μια ώρα, μέχρι να απομακρυνθεί το μεγαλύτερο ποσοστό υγρασίας. Στη συνέχεια, η πάστα που δημιουργήθηκε μεταφέρεται σε αντλία κενού για την πλήρη απομάκρυνση της υγρασίας. Οι ποσότητες αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα για κάθε σύμπλοκο αναλυτικά, ενώ υπολογίζεται η απόδοση της διεργασίας έπειτα από ξήρανση των συμπλόκων.

Πίνακας 4: Ποσότητες κιναζολινόνης και β-κυκλοδεξτρινών για την παραγωγή συμπλόκων εγκλεισμού με την μέθοδο kneading

Σύμπλοκο εγκλεισμού	Αναλογία κιναζολινόνης/κυκλοδεξτρίνης	Ποσότητα κυκλοδεξτρίνης (mg)	Ποσότητα κιναζολινόνης (mg)
Quin-β-CD	2:1	200	77.5
Quin-Me-β-CD	2:1	100	33.6
	1:1	100	16.8
Quin-HP-β-CD	2:1	100	30.2
	1:1	100	15.1

Στην συγκεκριμένη μέθοδο παρασκευάστηκε το σύμπλοκο εγκλεισμού κιναζολινόνης-β-κυκλοδεξτρίνης (Quin-β-CD) μόνο για την αναλογία 2:1, έπειτα από κατασκευή του διαγράμματος Job's Plot.

### Διάγραμμα Job's Plot για Quin-β-CD

Παρασκευάστηκαν διαλύματα ποσοτήτων κιναζολινόνης και β-CD σε διαλύτη αιθανόλη. Μετρήθηκαν οι απορροφήσεις των διαλυμάτων της κιναζολινόνης και των διαλυμάτων του μίγματος κιναζολινόνης και κυκλοδεξτρίνης και κατασκευάστηκε το διάγραμμα.

Πίνακας 5: Συγκεντρώσεις κιναζολινόνης και κιναζολινόνης+β-CD και οι αντίστοιχες απορροφήσεις των δειγμάτων

Quinazolinone (μM)	A <sub>quin</sub> (Abs)	β-CD (μM)	A <sub>quin+β-CD</sub> (Abs)
0	0	1000	0
100	0.0434329	900	0
200	0.0866289	800	0.00718382
300	0.161121	700	0.0500198
400	0.175833	600	0.0619142
500	0.233875	500	0.091911
600	0.264511	400	0.128613
700	0.318733	300	0.202229
800	0.356706	200	0.268758
900	0.404118	100	0.357616
1000	0.447066	0	0.449565



Διάγραμμα 1: Διάγραμμα Job's Plot για Quin-β-CD. Όπου ΔA η διαφορά απορροφήσεων κιναζολινόνης και μίγματος κιναζολινόνης και β-CD και  $R = \frac{[Quin]}{([Quin] + [\beta-CD])}$ .

Από το διάγραμμα προκύπτει  $R \approx 0.66$ , συνεπώς η βέλτιστη αναλογία για το σύμπλοκο εγκλεισμού κιναζολινόνης-β-CD είναι η 2:1.

## 2.5.2 Παρασκευή συμπλόκων εγκλεισμού μέσω μεθόδου εξάτμισης διαλύτη και λυοφιλοποίησης (Μέθοδος solvent evaporation & freeze drying)

Κατά την μέθοδο εξάτμισης διαλύτη και λυοφιλοποίησης, 100 mg κυκλοδεξτρίνης διαλύονται σε 20mL νερού. Η αντίστοιχη ποσότητα κιναζολινόνης διαλύεται στην μικρότερη δυνατή ποσότητα αιθανόλης και στην συνέχεια προστίθεται στο διάλυμα κυκλοδεξτρίνης. Έπειτα, το διάλυμα τοποθετείται για 5 λεπτά σε λουτρό υπερήχων και στην συνέχεια παραμένει σε μαγνητική ανάδευση για 1 ώρα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 4000 rpm για 15 λεπτά και το υπερκείμενο υγρό απομονώνεται, λυοφιλοποιείται και αποθηκεύεται στους 4°C και έπειτα σε ξηραντήρα.

Πίνακας 6: Ποσότητες κιναζολινόνης και β-κυκλοδεξτρίνων για την παραγωγή συμπλόκων εγκλεισμού με την μέθοδο solvent evaporation & freeze drying

Σύμπλοκο εγκλεισμού	Αναλογία κιναζολινόνης/κυκλοδεξτρίνης	Ποσότητα κυκλοδεξτρίνης (mg)	Ποσότητα κιναζολινόνης (mg)
Quin-β-CD	2:1	100	38.8
	1:1	100	19.4
Quin-Me-β-CD	2:1	100	33.6
	1:1	100	16.8
Quin-HP-β-CD	2:1	100	30.2
	1:1	100	15.1

## 2.6 Χαρακτηρισμός συμπλόκων εγκλεισμού

### 2.6.1 Απόδοση διεργασίας των συμπλόκων κιναζολινόνης- κυκλοδεξτρίνης

Η απόδοση διεργασίας υπολογίζεται από την μάζα του συμπλόκου προς το άθροισμα των αρχικών μαζών της κιναζολινόνης και της κυκλοδεξτρίνης.

$$\text{Απόδοση διεργασίας} = \frac{\text{μάζα συμπλόκου εγκλεισμού μετά την ξήρανση [mg]}}{\text{μάζα κιναζολινόνης [mg] + μάζα κυκλοδεξτρίνης [mg]}} \times 100\%$$

### 2.6.2 Απόδοση εγκλεισμού των συμπλόκων κιναζολινόνης- κυκλοδεξτρίνης

Η απόδοση εγκλεισμού υπολογίζει το ποσοστό της κιναζολινόνης που εγκλείστηκε στο σχηματισμένο σύμπλοκο εγκλεισμού σχετικά με την συνολική μάζα της κιναζολινόνης που χρησιμοποιήθηκε. Συνεπώς, υπολογίζεται μέσω της σχέσης:

$$\text{Απόδοση εγκλεισμού} = \frac{\text{μάζα εγκλεισμένης κιναζολινόνης [mg]}}{\text{αρχική μάζα κιναζολινόνης προς εγκλεισμό [mg]}} \times 100\%$$

Η απόδοση εγκλεισμού υπολογίζεται έμμεσα μέσω φασματοφωτομετρίας υπεριώδους-ορατού (UV-Vis Spectroscopy). Μέσω της απορρόφησης και χρησιμοποιώντας πρότυπη

καμπύλη απορρόφησης - συγκέντρωσης κιναζολινόνης, προσδιορίζεται η ποσότητα της κιναζολινόνης που έχει εγκλειστεί στο δείγμα και αναγωγικά σε όλο το σύμπλοκο.

Η προετοιμασία δείγματος για την φασματοφωτομετρία είναι η εξής:

Κατάλληλη ποσότητα συμπλόκου διαλύεται σε DMSO ώστε να σχηματιστεί διάλυμα 1mg/mL. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για τουλάχιστον μία ώρα και στην συνέχεια τοποθετείται για 5 λεπτά σε λουτρό υπερήχων. Αν κατά την μέτρηση στο όργανο UV-Vis διαπιστωθεί ότι το διάλυμα είναι πυκνό, πραγματοποιείται αραιώση 1:10 έως ότου προκύψουν απορροφήσεις με τιμές 0.1-1.

### 2.6.3 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης ένωσης μέσω φασματοφωτομετρίας υπεριώδους – ορατού (UV-Vis)

Η φασματοφωτομετρία υπεριώδους – ορατού χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων της κιναζολινόνης στο κάθε δείγμα. Η ακτινοβολία υπεριώδους – ορατού απορροφάται από 190 έως 800 nm από μόρια του δείγματος που δεν έχουν υποστεί ηλεκτρονικές μεταπτώσεις.

Για την εύρεση της συγκέντρωσης κιναζολινόνης στα δείγματα συμπλόκου είναι απαραίτητη η κατασκευή πρότυπης καμπύλης της ένωσης, η οποία θα συσχετίζει την απορρόφηση με την συγκέντρωση της κιναζολινόνης στο εκάστοτε δείγμα.

Για την κατασκευή της καμπύλης, κατάλληλη ποσότητα κιναζολινόνης διαλύεται σε αιθανόλη ώστε να σχηματιστεί διάλυμα 0.1 mg/mL. Ακολουθούν αραιώσεις σε αιθανόλη με σκοπό την δημιουργία μιας σειράς γνωστών συγκεντρώσεων διαλυμάτων κιναζολινόνης. Έπειτα, λαμβάνεται η απορρόφηση για κάθε ένα από τα διαλύματα και κατασκευάζεται το διάγραμμα αναφοράς. Όλες οι απορροφήσεις πρέπει να παίρνουν τιμές από 0.1 έως 1. Σε αντίθετη περίπτωση, τα διαλύματα αραιώνονται κατά 1:10.

### 2.6.4 Προσδιορισμός μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς PDI και ζ-δυναμικού μέσω Dynamic Light Scattering (DLS)

Για τον προσδιορισμό του μεγέθους του συμπλόκου, του δείκτη πολυδιασποράς και του ζ-δυναμικού χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS). Από κάθε δείγμα συμπλόκου ζυγίζεται ποσότητα ίση με 1 mg και διαλύεται σε 20 mL υπερκάθαρου νερού και στην συνέχεια αφήνεται για περίπου μία ώρα σε ανάδευση. Έπειτα, τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για 5 λεπτά για καλύτερη και ομοιόμορφη διασπορά και στην συνέχεια μέσω σύριγγας τοποθετείται σε κυψελίδα τύπου U. Η πλήρωση της κυψελίδας γίνεται προσεκτικά χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες και μέχρι την διαβροχή των ηλεκτροδίων της. Για την μέτρηση των παραπάνω μεγεθών, χρησιμοποιείται ένα αρχείο «τυποποιημένης διαδικασίας λειτουργίας» που περιέχει πληροφορίες για το δείγμα, την κυψελίδα και το πρωτόκολλο μέτρησης. Για το κάθε δείγμα πραγματοποιούνται 3 μετρήσεις και υπολογίζεται ο μέσος όρος αυτών.

### 2.6.5 Φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR

Για τον χαρακτηρισμό τους, τα σύμπλοκα εγκλεισμού ελέγχονται με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR). Αρχικά, για κάθε σύμπλοκο παρασκευάζεται στερεή παστίλια με μια μικρή ποσότητα ένωσης, η οποία λιοτριβεται με ξηρό βρωμιούχο κάλιο KBr, αναλογία περίπου 1:100. Το βρωμιούχο κάλιο διατηρείται σε ξηραντήρα καθ' όλη την διάρκεια της διαδικασίας, καθώς είναι υγροσκοπικό. Λαμβάνονται φάσματα κυματαριθμών ( $\text{cm}^{-1}$ ) συναρτήσεως της αλληλεπίδρασης της ένωσης με την υπέρυθη ακτινοβολία. Το εύρος των κυματαριθμών είναι μεταξύ  $4000 \text{ cm}^{-1}$  και  $400 \text{ cm}^{-1}$ . Λαμβάνονται ξεχωριστά τα φάσματα των τριών κυκλοδεξτρινών που χρησιμοποιήθηκαν ( $\beta$ -CD, Me- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD), της κιναζολινόνης και στην συνέχεια των συμπλόκων εγκλεισμού. Η συγκεκριμένη φασματοσκοπία χρησιμοποιείται για την μελέτη της αλληλεπίδρασης της κιναζολινόνης με τον φορέα εγκλεισμού της, μέσω των διαφορών που εντοπίζονται στα φάσματα των συμπλόκων με βάση τις πρότυπες ενώσεις.

### 2.6.6 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (H-NMR)

Για την ταυτοποίηση των συμπλόκων εγκλεισμού απαιτούνται φάσματα  $^1\text{H}$  NMR. Δείγμα 10 mg από κάθε σύμπλοκο διαλυτοποιείται σε δευτεριωμένο νερό ( $\text{D}_2\text{O}$ ), ενώ το δείγμα κιναζολινόνης διαλυτοποιείται σε δευτεριωμένο διμεθυλο-σουλφοξείδιο ( $\text{DMSO-d}_6$ ). Η ανάλυση της κιναζολινόνης και των συμπλόκων πραγματοποιήθηκε σε φασματογράφο 600 MHz.

Το φάσμα αποδίδει τις χημικές μετατοπίσεις σε ppm, τις σταθερές σύζευξης J σε Hz και η πολλαπλότητα των κορυφών αναφέρεται ως:

- s (singlet, απλή)
- d (doublet, διπλή)
- t (triplet, τριπλή)
- q (quartet, τετραπλή)
- m (multiplet, πολλαπλή)
- br (broad, ευρεία)
- dd (double of doublets, διπλή διπλών)
- tt (triple of triplets, τριπλή τριπλών)
- td (triple of doublets, τριπλή διπλών)

## 2.7 Μελέτη απελευθέρωσης

Για την μελέτη της απελευθέρωσης της κιναζολινόνης από τις κυκλοδεξτρίνες, παρασκευάζεται ένα ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  και  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) με  $\text{pH} = 7.4$ . Σε φιαλίδια των 3 mL προστίθενται 2,5 mg συμπλόκου και 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος. Τα φιαλίδια αυτά τοποθετούνται σε επωαστήρα με ανάδευση στις 100 rpm και θερμοκρασία σταθερή στους  $37^\circ\text{C}$  και σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα γίνεται η δειγματοληψία. Πριν την μέτρηση, προστίθεται χωρίς ανάδευση 500  $\mu\text{L}$  DMSO στο δείγμα

για να διαλυτοποιηθεί η κιναζολινόνη. Αμέσως μετά, λαμβάνονται 50  $\mu\text{L}$  από το δείγμα και τοποθετούνται σε κυψελίδα ενώ παράλληλα αραιώνονται με ρυθμιστικό διάλυμα στον τελικό όγκο των 3 mL.

Μέσω της φασματοφωτομετρίας UV-Vis και της πρότυπης καμπύλης της κιναζολινόνης, προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ένωσης που έχει διαλυτοποιηθεί στο δείγμα και με την κατάλληλη αναγωγή υπολογίζεται η συγκέντρωση της ένωσης που έχει απελευθερωθεί στο κάθε φιαλίδιο για το αντίστοιχο χρονικό διάστημα. Σύμφωνα με αυτές τις συγκεντρώσεις, κατασκευάζονται διαγράμματα του ποσοστιαίου ρυθμού απελευθέρωσης για την μελέτη του προφίλ απελευθέρωσης, καθώς κατασκευάζονται και τα διαγράμματα κινητικών μοντέλων απελευθέρωσης.

## 2.8 Βιολογικές δοκιμές – Αλληλεπίδραση με το DNA

### 2.8.1 Μελέτη αλληλεπίδρασης *in vitro*

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων εγκλεισμού με το DNA ακολουθείται η εξής μεθοδολογία:

Αρχικά, παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (10 mM). Ζυγίζονται 605.7 mg Tris και διαλύονται σε 500 mL υπερκάθαρου νερού. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στα 7.4 με τη χρήση σταγόνων HCl (10% v/v). Στη συνέχεια, παρασκευάζεται διάλυμα DNA με διάλυση ιών φυσικού DNA από θύμο αδένα βοοειδούς (ct-DNA), 1 mg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (10 mM), το οποίο αναδεύεται για 24 ώρες υπό ψύξη (4°C).

*Η συγκέντρωση του διαλύματος DNA ανά νουκλεοτίδιο υπολογίζεται με φασματοσκοπία απορρόφησης και υπολογίζεται από το πηλίκο της απορρόφησης του διαλύματος στα 260nm, που είναι  $6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Ο λόγος της UV απορρόφησης είναι 1.8-1.9:1, το οποίο υποδηλώνει ότι το DNA είναι ελεύθερο από πρωτεΐνες. Το διάλυμα μπορεί να παραμείνει στο ψυγείο το πολύ για 4 μέρες και πριν την επαναχρησιμοποίηση του ελέγχεται με φάσμα ηλεκτρονικής απορρόφησης.*

Έπειτα, παρασκευάζονται διαλύματα DNA διαφορετικών συγκεντρώσεων από το πυκνό διάλυμα DNA 1 mg/mL, αραιώνοντας κατάλληλες ποσότητες με το ρυθμιστικό διάλυμα Tris σε τελικό όγκο 10 mL. Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάζονται αραιά διαλύματα DNA συγκεντρώσεων 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400 και 500  $\mu\text{M}$ .

Παρασκευάζονται, επίσης, διαλύματα κιναζολινόνης και κυκλοδεξτρινών με συγκέντρωση 10 mM ως δείγματα «blank», με σκοπό την μελέτη αλληλεπίδρασής τους με το DNA ως πρότυπες ενώσεις. Κατάλληλη ποσότητα κιναζολινόνης διαλυτοποιήθηκε σε 1 mL DMSO, ενώ για τα διαλύματα των κυκλοδεξτρινών χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης το ρυθμιστικό Tris. Μικρή ποσότητα από τα διαλύματα (1  $\mu\text{L}$ ) αραιώνεται με διάλυμα DNA, διαφορετικής συγκέντρωσης για κάθε μέτρηση, σε τελικό όγκο 1 mL. Στην συνέχεια, το κάθε δείγμα τοποθετείται στον επωαστήρα για 30 λεπτά, με ανάδευση 100 rpm και σε σταθερή θερμοκρασία 37 °C και έπειτα τοποθετείται στον όργανο UV-Vis.

Παρόμοια διαδικασία ακολουθείται και για τα σύμπλοκα. Αναλυτικότερα, κατάλληλη ποσότητα διαλύεται σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris, τοποθετούνται για επώαση

συγκεκριμένο χρονικό διάστημα ώστε να επιτευχθεί σε ικανοποιητικό ποσοστό απελευθέρωση της κιναζολινόνης και στην συνέχεια μικρή ποσότητα αναμειγνύεται με DNA, διαφορετικών συγκεντρώσεων κάθε φορά, σε τελικό όγκο 1 mL. Έπειτα, αφήνεται για επώαση 5 λεπτά (100 rpm, θερμοκρασία 37 °C) και τοποθετείται στο όργανο UV-Vis.

Μελετώνται οι μεταβολές που λαμβάνουν χώρα στα φάσματα UV (250-400 nm) των διαλυμάτων με την προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων του ct-DNA και καταγράφονται οι μεταβολές τόσο της απορρόφησης όσο και της τιμής του  $\lambda_{\max}$ .

Οι παρατηρούμενες μεταβολές μπορούν να οδηγήσουν σε αξιόπιστα συμπεράσματα σχετικά με το είδος της αλληλεπίδρασης. Η σταθερά σύνδεσης  $K_b$  της ένωσης με το ct-DNA προσδιορίζεται από τον λόγο της τεταγμένης επί της αρχής προς την κλίση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων, που προσδιορίζεται σε διαγράμματα του λόγου σε συνάρτηση με την συγκέντρωση του DNA με βάση την εξίσωση Benesi – Hildebrand.

$$\frac{1}{A_f - A_{\text{obs}}} = \frac{1}{A_f - A_{fc}} + \frac{1}{(A_f - A_{fc}) \cdot [\text{DNA}] \cdot K_b} \quad \text{Εξίσωση Benesi – Hildebrand}$$

όπου  $K_b$  η σταθερά ισχύος σύνδεσης της ένωσης με το DNA,  $A_f$  η απορρόφηση της ελεύθερης ένωσης,  $A_{\text{obs}}$  η παρατηρούμενη απορρόφηση της δεσμευμένης ένωσης,  $A_{fc}$  η απορρόφηση κορεσμού.

### 2.8.2 Μελέτη αλληλεπίδρασης *in silico*

Με σκοπό την υπολογιστική μελέτη αλληλεπίδρασης της κιναζολινόνης με το DNA, χρησιμοποιήθηκαν διάφορα προγράμματα. Αρχικά, λαμβάνεται η κρυσταλλική δομή του DNA από το RSCB Protein Data Bank (PDB ID: 1bna), ενώ η ένωση σχεδιάζεται μέσω του προγράμματος HyperChem 8.0. Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων σύνδεσης επιτυγχάνεται μέσω του προγράμματος AutoDock Vina με την εφαρμογή εμπειρικής λειτουργίας ελεύθερης ενέργειας. Μέσω του AutoDock Tools προστίθενται μόνο πολικά υδρογόνα στο DNA. Για την απεικονιστική μελέτη της αλληλεπίδρασης χρησιμοποιείται το λογισμικό PyMol, σύμφωνα με το οποίο εντοπίζονται τα νουκλεοτίδια που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση αυτή.

### 3. Αποτελέσματα – συζήτηση

#### 3.1 Απόδοση διεργασίας εγκλεισμού

Οι αποδόσεις διεργασίας εγκλεισμού για τα σύμπλοκα που παρασκευάστηκαν υπολογίζονται με βάση την εξίσωση:

$$\text{Απόδοση Διεργασίας} = \frac{\text{ολική μάζα νανοσωματιδίων που συλλέχθηκε (mg)}}{\text{αρχική μάζα συστατικών (mg)}} \cdot 100 \%$$

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι αποδόσεις διεργασίας των συμπλόκων που παρασκευάστηκαν με την μέθοδο υγρής λειοτριβήσης.

Πίνακας 7: Αποδόσεις διεργασίας συμπλόκων εγκλεισμού που συντέθηκαν με την μέθοδο kneading

Σύμπλοκα	Αναλογία κινναζολινόνης/ κυκλοδεξτρίνης	Μάζα νανοσωματιδίων που συλλέχθηκε (mg)	Αρχική μάζα συστατικών (mg)	Απόδοση διεργασίας (%)
Quin-β-CD	2:1	185.9	277.5	67
Quin-Me-β-CD	2:1	113.5	133.9	84.8
Quin-Me-β-CD	1:1	92.9	117.3	79.2
Quin-HP-β-CD	2:1	93.9	130.3	72.1
Quin-HP-β-CD	1:1	90.3	115.1	78.5

Στον επόμενο πίνακα παρουσιάζονται οι αποδόσεις διεργασίας των συμπλόκων που παρασκευάστηκαν με την μέθοδο εξάτμισης διαλύτη και λυοφιλοποίησης.

Πίνακας 8: Αποδόσεις διεργασίας συμπλόκων εγκλεισμού που συντέθηκαν με την μέθοδο solvent evaporation & freeze drying

Σύμπλοκα	Αναλογία κινναζολινόνης/ κυκλοδεξτρίνης	Μάζα νανοσωματιδίων που συλλέχθηκε (mg)	Αρχική μάζα συστατικών (mg)	Απόδοση διεργασίας (%)
Quin-β-CD	2:1	95.5	138.8	68.8
Quin-β-CD	1:1	108.1	119.4	90.5
Quin-Me-β-CD	2:1	111.0	133.6	83.1
Quin-Me-β-CD	1:1	99.6	116.9	85.2
Quin-HP-β-CD	2:1	102.7	130.4	78.8
Quin-HP-β-CD	1:1	96.8	115.7	83.7

Συγκρίνοντας τις αποδόσεις των δύο μεθόδων, παρατηρείται ότι δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές. Κατά την μέθοδο kneading, οι αποδόσεις διεργασίας κυμαίνονται από περίπου 67% έως 85%, ενώ κατά την μέθοδο solvent evaporation & freeze drying εμφανίζονται αποδόσεις 69% - 90%.



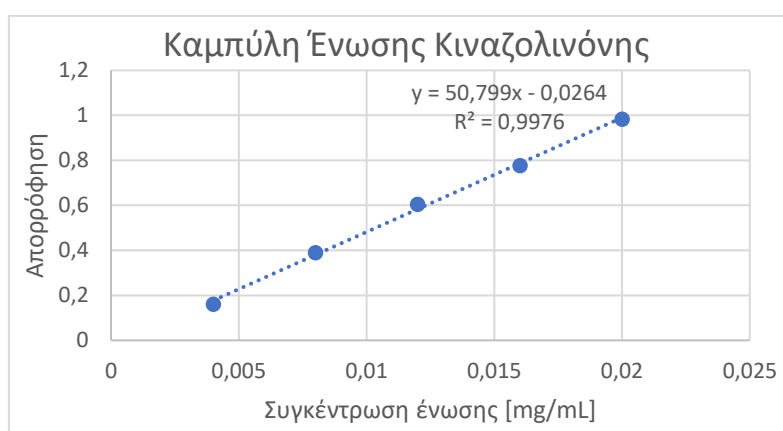
Αναφορικά με την μέθοδο kneading, η μεγαλύτερη απόδοση (84.8%) παρατηρείται για το σύμπλοκο Quin-Me-β-CD με αναλογία 2:1.

Η δεύτερη συνδυαστική μέθοδος solvent evaporation & freeze drying παρουσιάζει μεγαλύτερη απόδοση (90.5%) για το σύμπλοκο Quin-β-CD με αναλογία 1:1.

### 3.2 Απόδοση εγκλεισμού

Για τον υπολογισμό απόδοσης εγκλεισμού σε κάθε ένα από τα σύμπλοκα, κατασκευάστηκε αρχικά η καμπύλη της ένωσης με διαλύτη αιθανόλη. Η εξίσωση απορρόφησης-συγκέντρωσης που προέκυψε είναι η εξής:

$$y = 50.799 \cdot x + 0.0264$$



Διάγραμμα 2: Καμπύλη ένωσης κιναζολινόνης για  $\lambda=321.8 \text{ nm}$

Οι αποδόσεις εγκλεισμού των συμπλόκων υπολογίστηκαν μέσω της καμπύλης ένωσης και της παρακάτω εξίσωσης:

$$\text{Απόδοση εγκλεισμού} = \frac{\text{μάζα ουσίας που εγκλείστηκε (mg)}}{\text{αρχική μάζα ουσίας προς εγκλεισμό (mg)}} \cdot 100 \%$$

Παρακάτω παρουσιάζονται οι αποδόσεις εγκλεισμού των συμπλόκων που παρασκευάστηκαν με την μέθοδο υγρής λειοτρίβησης.

Πίνακας 9: Αποδόσεις εγκλεισμού των συμπλόκων που συντέθηκαν με την μέθοδο kneading

Σύμπλοκα	Αναλογία κινναζολινόνης/ κυκλοδεξτρίνης	Απορρόφηση	Μάζα ουσίας που εγκλείστηκε στο σύμπλοκο (mg)	Αρχική μάζα ουσίας προς εγκλεισμό (mg)	Απόδοση εγκλεισμού (%)
Quin-β-CD	2:1	0.625483	64.0	77.5	82.6
Quin-Me-β-CD	2:1	0.797331	18.4	33.8	54.4
Quin-Me-β-CD	1:1	0.608483	11.6	16.9	68.6
Quin-HP-β-CD	2:1	0.807887	15.4	30.2	51.0
Quin-HP-β-CD	1:1	0.495959	9.3	15.1	61.6

Στον επόμενο πίνακα παρουσιάζονται οι αποδόσεις διεργασίας των συμπλόκων που παρασκευάστηκαν με την μέθοδο εξάτμισης διαλύτη και λυοφιλοποίησης.

Πίνακας 10: Αποδόσεις εγκλεισμού των συμπλόκων που συντέθηκαν με την μέθοδο solvent evaporation & freeze drying

Σύμπλοκα	Αναλογία κινναζολινόνης/κυκλοδεξτρίνης	Απορρόφηση	Μάζα ουσίας που εγκλείστηκε στο σύμπλοκο (mg)	Αρχική μάζα ουσίας προς εγκλεισμό (mg)	Απόδοση εγκλεισμού (%)
Quin-β-CD	2:1	0.768612	24.1	38.8	62.1
Quin-β-CD	1:1	0.724520	13.9	19.4	71.6
Quin-Me-β-CD	2:1	0.856146	19.3	33.6	57.4
Quin-Me-β-CD	1:1	0.604266	12.4	16.9	73.4
Quin-HP-β-CD	2:1	0.767471	16.1	30.2	53.3
Quin-HP-β-CD	1:1	0.668816	13.2	15.2	86.8

Παρατηρείται ότι οι αποδόσεις εγκλεισμού κυμαίνονται στο ίδιο εύρος, από περίπου 50 έως 87%. Όμως, για τα σύμπλοκα Quin-Me-β-CD και Quin-HP-β-CD που παρασκευάστηκαν με την μέθοδο εξάτμισης διαλύτη και λυοφιλοποίησης, οι αποδόσεις εγκλεισμού είναι μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες που εμφανίζει η μέθοδος υγρής λειοτριβήσης. Κάτι τέτοιο δεν ισχύει για το σύμπλοκο Quin-β-CD (2:1).

Συνολικά, η μεγαλύτερη απόδοση εγκλεισμού για τα σύμπλοκα της μεθόδου υγρής λειοτριβήσης αφορά το σύμπλοκο Quin-β-CD με αναλογία 2:1 και είναι ίση με 82.6%. Αντιστοίχα, για τα σύμπλοκα της δεύτερης μεθόδου, η μεγαλύτερη απόδοση είναι ίση με 86.8% και παρατηρείται για το σύμπλοκο Quin-HP-β-CD με αναλογία 1:1.

### 3.3 Υπολογισμός μεγέθους, κατανομή μεγέθους και ζ-δυναμικό μέσω της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS)

Ο υπολογισμός του μεγέθους, του δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και του ζ-δυναμικού συμβάλλουν στον πλήρη χαρακτηρισμό των συμπλόκων εγκλεισμού. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα παραπάνω μεγέθη για κάθε ένα από τα σύμπλοκα.

Πίνακας 11: Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό για τα σύμπλοκα εγκλεισμού που παρασκευάστηκαν με την μέθοδο kneading

Σύμπλοκα	Αναλογία κινναζολινόνης/κυκλοδεξτρίνης	Μέγεθος (nm)	Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)	ζ-δυναμικό (mV)
Quin-β-CD	2:1	194.8 ± 4.2	0.518 ± 0.022	-20.4 ± 1.2
Quin-Me-β-CD	2:1	311.6 ± 8.5	0.394 ± 0.040	-4.4 ± 0.5
Quin-Me-β-CD	1:1	434.3 ± 25.6	0.453 ± 0.028	-7.6 ± 1.3
Quin-HP-β-CD	2:1	313.1 ± 22.2	0.372 ± 0.043	-16.0 ± 2.2
Quin-HP-β-CD	1:1	283.7 ± 55.3	0.462 ± 0.095	-28.4 ± 4.6

Όπως φαίνεται από τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα, το μέγεθος των συμπλόκων εγκλεισμού που παρασκευάστηκαν με την μέθοδο kneading κυμαίνεται από 194.8 nm έως 434.3 nm. Συνεπώς, το μέγεθος των συμπλόκων θεωρείται ικανοποιητικό. Ο δείκτης πολυδιασποράς λαμβάνει τιμές από 0.372 έως 0.518 επιβεβαιώνοντας την ομοιόμορφη κατανομή μεγέθους. Το ζ-δυναμικό παρουσιάζει αρνητικές τιμές, γεγονός που οφείλεται στην παρουσία των υδροξυλίων στην επιφάνεια των β-κυκλοδεξτρινών. Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές του ζ-δυναμικού των συμπλόκων κυμαίνονται από -28.4 mV έως -4.4 mV. Απόλυτη τιμή ζ-δυναμικού κοντά στα 30 mV υποδεικνύει ηλεκτρικά σταθερή διασπορά συμπλόκων χωρίς τάση για συσσωμάτωση. Αντιθέτως, στην περίπτωση που το ζ-δυναμικό (κατ' απόλυτη τιμή) είναι σχετικά χαμηλό η έλξη μεταξύ των συμπλόκων υπερβαίνει την άπωση δημιουργώντας συσσωματώματα. Με βάση τα παραπάνω, τα σύμπλοκα εμφανίζουν υψηλές τιμές ζ-δυναμικού και συνεπώς εξασφαλίζεται η σταθερή διασπορά τους. Εξαιρέση αποτελούν τα σύμπλοκα Quin-Me-β-CD, τα οποία εμφανίζουν σχετικά χαμηλές (κατ' απόλυτη τιμή) τιμές ζ-δυναμικού. Αυτό υποδηλώνει ότι τα συγκεκριμένα σύμπλοκα εμφανίζουν ασταθή διασπορά με τάση για συσσωμάτωση.

Πίνακας 12: Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό για τα σύμπλοκα εγκλεισμού που παρασκευάστηκαν με την μέθοδο solvent evaporation & freeze drying

Σύμπλοκα	Αναλογία κινναζολινόνης/ κυκλοδεξτρίνης	Μέγεθος (nm)	Δείκτης πολυδιασποράς (PDI)	ζ-δυναμικό (mV)
Quin-β-CD	2:1	226.6 ± 18.4	0.636 ± 0.059	-22.2 ± 1.3
Quin-β-CD	1:1	199.4 ± 10.0	0.313 ± 0.049	-20.3 ± 0.7
Quin-Me-β-CD	2:1	647.8 ± 88.4	0.568 ± 0.100	-15.5 ± 1.7
Quin-Me-β-CD	1:1	334.2 ± 19.0	0.549 ± 0.084	-16.5 ± 3.2
Quin-HP-β-CD	2:1	390.0 ± 19.2	0.436 ± 0.016	-12.2 ± 2.9
Quin-HP-β-CD	1:1	422.3 ± 55.4	0.579 ± 0.133	-13.4 ± 2.5

Σύμφωνα με τις μετρήσεις για τα σύμπλοκα εγκλεισμού που παρασκευάστηκαν με την μέθοδο solvent evaporation & freeze drying, το μέγεθος των συμπλόκων κυμαίνεται από 199.4 nm έως 647.8 nm και χαρακτηρίζεται ικανοποιητικό. Ο δείκτης PDI παίρνει τιμές από 0.313 έως 0.636, οι οποίες υποδεικνύουν την ομοιόμορφη κατανομή των συμπλόκων. Τέλος, τα σύμπλοκα εμφανίζουν (κατ' απόλυτη τιμή) μεγάλες τιμές ζ-δυναμικού, γεγονός που επιβεβαιώνει την σταθερή διασπορά των συμπλόκων και την αποφυγή δημιουργίας συσσωμάτων.

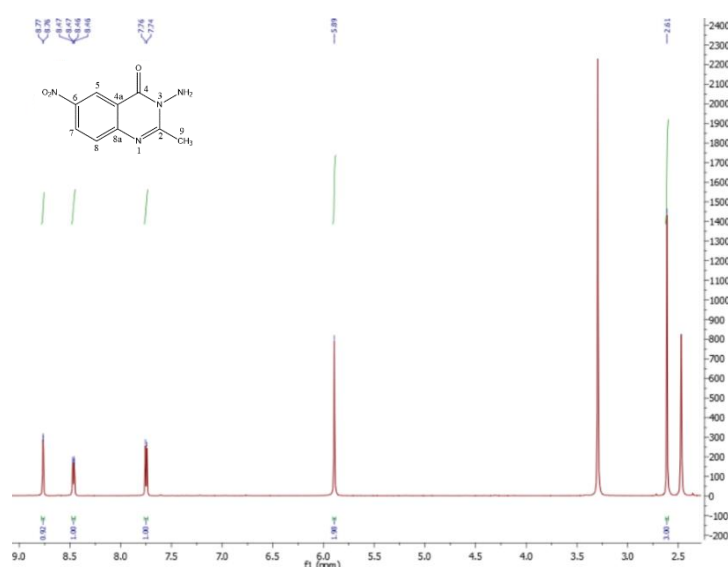
Από τα αποτελέσματα της μεθόδου DLS παρατηρείται ότι το μέγεθος των συμπλόκων εγκλεισμού εμπίπτει στην νανοκλίμακα, συνεπώς τα σύμπλοκα χαρακτηρίζονται ως νανοσυστήματα.

Τα διαγράμματα κατανομής μεγέθους και ζ-δυναμικού των συμπλόκων παρουσιάζονται στο Παράρτημα Εικόνων.

### 3.4 Φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Η ταυτοποίηση των ενώσεων και των συμπλόκων εγκλεισμού και ο χαρακτηρισμός της δομής τους πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR. Πιο συγκεκριμένα, λήφθηκαν τα φάσματα NMR της κάθε κυκλοδεξτρίνης που χρησιμοποιήθηκε, της κιναζολινόνης και των συμπλόκων. Τα συμπεράσματα για τις πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της κιναζολινόνης (φιλοξενούμενο μόριο) και των κυκλοδεξτρινών (φορείς εγκλεισμού) προκύπτουν από την συγκριτική μελέτη των φασμάτων και την διαφορά των χημικών μετατοπίσεων που πιθανόν να εντοπιστούν στις κορυφές πρωτονίων που εμφανίζονται στα φάσματα NMR.

#### 3.4.1 Φάσμα NMR της κιναζολινόνης



Εικόνα 41: Φάσμα πρωτονίου  $^1\text{H}$  NMR της 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτρο-κιναζολιν-4(3H)-όνης (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )

Η δομή της 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτροκιναζολιν-4(3H)-όνης φαίνεται στην Εικόνα 41 μαζί με το φάσμα πρωτονίου. Στην ένωση υπάρχουν 3 αρωματικά υδρογόνα (στις θέσεις C-5, C-7 και C-8), 2 υδρογόνα της ομάδας  $-\text{NH}_2$  και 3 υδρογόνα της μέθυλο-ομάδας.

Στα χαμηλά πεδία του φάσματος αναμένεται να εμφανιστούν τα πιο αποπροστατευμένα πρωτόνια της ένωσης. Συγκεκριμένα, στην περιοχή 7.70-8.80 ppm εμφανίζονται τρεις κορυφές που αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια της ένωσης.

Η πρώτη κορυφή εμφανίζεται στα 8.77 ppm και ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο, καθώς αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης C-5. Το πρωτόνιο αυτό είναι το πιο αποπροστατευμένο, διότι βρίσκεται πιο κοντά στα ηλεκτραρνητικά οξυγόνα και άρα μπορεί πιο εύκολα να γίνει η σχάση του. Στα 8.76 ppm εμφανίζεται μια δεύτερη κορυφή με μικρότερη σχάση, η οποία οφείλεται στο πρωτόνιο της θέσης C-7 και εμφανίζεται λόγω καλής ακρίβειας του οργάνου.

Η δεύτερη κορυφή είναι διπλή και εμφανίζεται 8.47 ppm, ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο υδρογόνο της θέσης C-7. Η διπλή πολλαπλότητά της οφείλεται στην σχάση του υδρογόνου της θέσης C-8, ενώ εμφανίζονται και δύο μικρότερες κορυφές λόγω

ακρίβειας οργάνου που οφείλονται στην σχάση του υδρογόνου στην θέση C-5, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω.

Η τρίτη κορυφή είναι διπλή και εμφανίζεται στα 7.75 ppm, ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο υδρογόνο της θέσης C-8. Η διπλή κορυφή οφείλεται στην σχάση του γειτονικού υδρογόνου στην θέση C-7.

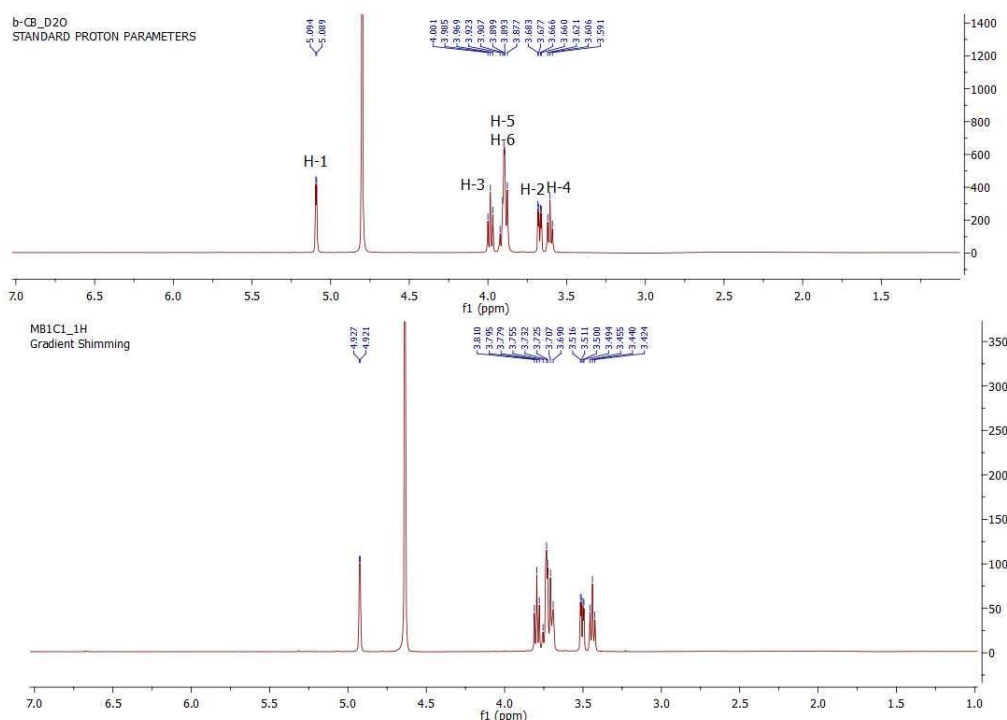
Στα υψηλά πεδία του φάσματος αναμένεται να εμφανιστούν τα πιο προστατευμένα πρωτόνια της ένωσης. Συγκεκριμένα, παρατηρούνται τα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της ομάδας του μεθυλίου με μια απλή κορυφή στα 2.61 ppm.

Τέλος, εντοπίζεται μια απλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για τα δύο ισοδύναμα υδρογόνα της ομάδας -NH<sub>2</sub> στα 5.89 ppm.

Οι κορυφές που εμφανίζονται περίπου στα 2.5 ppm και 3.3 ppm δεν ολοκληρώνονται καθώς αφορούν τον διαλύτη DMSO και το H<sub>2</sub>O (υγρασία) αντίστοιχα.

### 3.4.2 Φάσματα NMR της β-CD και συμπλόκου Quin-β-CD

Τα συγκριτικά φάσματα NMR της β-CD και του συμπλόκου κιναζολινόνης-β-CD παρουσιάζονται στην Εικόνα 42.



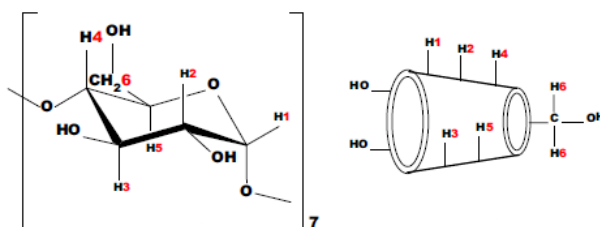
Εικόνα 42: Φάσματα πρωτονίου <sup>1</sup>H NMR της β-CD και Quin-β-CD (600 MHz, D2O)

Με βάση τα φάσματα υπολογίζονται οι χημικές μετατοπίσεις της καθαρής β-CD και του συμπλόκου κιναζολινόνης-β-CD (2:1 μέσω της μεθόδου solvent evaporation & freeze drying) και στη συνέχεια πραγματοποιείται σύγκριση.

Πίνακας 13: Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της β-CD και του συμπλόκου Quin-β-CD (2:1, solvent evaporation & freeze drying)

Πρωτόνια	Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της β-CD, δ <sub>1</sub> (ppm)	Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του Quin-β-CD, δ <sub>2</sub> (ppm)	Δδ = δ <sub>2</sub> - δ <sub>1</sub>
H-1	5.091	4.924	-0.167
H-2	3.672	3.505	-0.167
H-3	3.985	3.795	-0.190
H-4	3.606	3.440	-0.166
H-5	3.900	3.723	-0.177
H-6	3.900	3.723	-0.177

Από τη συγκριτική μελέτη των μετατοπίσεων της καθαρής β-CD και του συμπλόκου Quin-β-CD, παρατηρούνται μεγάλες και παρόμοιες διαφορές μετατοπίσεων σε όλα τα πρωτόνια.



Εικόνα 43: Στερεοχημική δομή της β-κυκλοδεξτρίνης (αριστερά) και απεικόνιση της τριδιάστατης δομής του κίλουρου κώνου με τα εσωτερικά και εξωτερικά πρωτόνια (δεξιά).<sup>38</sup>

Όπως απεικονίζεται και στην Εικόνα 43, τα πρωτόνια H-3 και H-5 βρίσκονται στο εσωτερικό της υδρόφοβης κοιλότητας της β-CD ενώ το H-6 βρίσκεται κοντά σε αυτήν. Γι' αυτόν τον λόγο, οι χημικές μετατοπίσεις που παρατηρούνται σε αυτά τα πρωτόνια είναι σημαντικές καθώς υποδεικνύουν την αλληλεπίδραση της κιναζολινόνης με την εσωτερική υδρόφοβη κοιλότητα της β-CD και συνεπώς τον σχηματισμό του συμπλόκου εγκλεισμού.

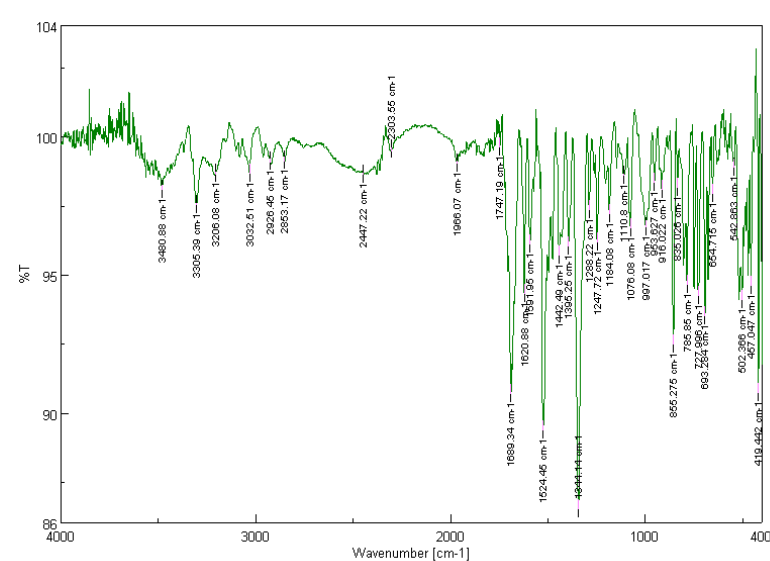
Εκτός από τα πρωτόνια αυτά, παρατηρούνται όμοιες διαφορές μετατοπίσεων και στα πρωτόνια H-1, H-2 και H-4 που βρίσκονται στην εξωτερική, υδρόφιλη επιφάνεια της β-CD. Αυτό ενδεχομένως συνεπάγεται ότι στα παραγόμενα σύμπλοκα εγκλεισμού πιθανόν η κιναζολινόνη να έχει προσκολληθεί και στην εξωτερική επιφάνεια της κυκλοδεξτρίνης. Κάτι τέτοιο θα εξηγούσε και το χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα του συμπλόκου, το οποίο προσδίδει η 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτροκιναζολινόνη.

### 3.5 Φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR

Συνδυαστικά με τα φάσματα <sup>1</sup>H NMR, η μελέτη της δομής των συμπλόκων πραγματοποιείται και με φασματοσκοπία FT-IR.

Για τον χαρακτηρισμό των συμπλόκων, γίνεται συγκριτική μελέτη των φασμάτων FT-IR της ένωσης, της β-κυκλοδεξτρίνης που χρησιμοποιήθηκε και του συμπλόκου.

### 3.5.1 Φάσμα FT-IR της κιναζολινόνης

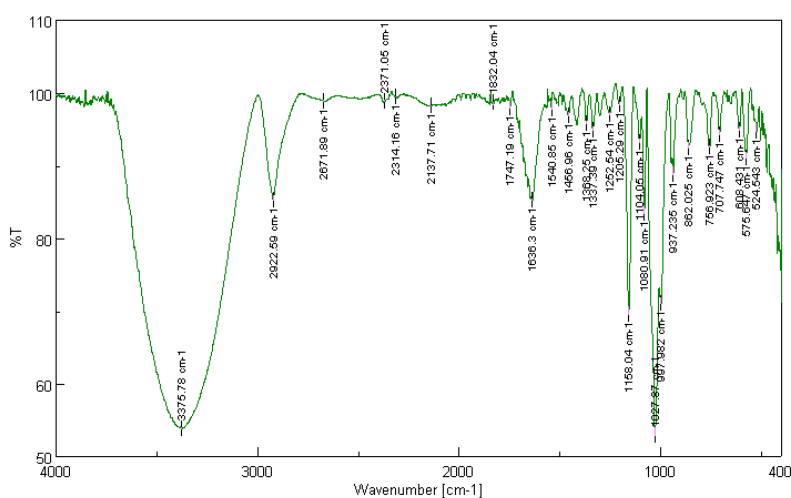


Εικόνα 44: Φάσμα FT-IR της ένωσης 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτροκιναζολιν-4(3H)-όνη

Από το φάσμα της ένωσης, παρατηρείται ότι οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται:

- στα  $3480.88 \text{ cm}^{-1}$ , κορυφή που αποδίδεται στην δόνηση τάσης N-H
- στα  $1689.34 \text{ cm}^{-1}$ , κορυφή που αποδίδεται στην δόνηση τάσης C=O του καρβονυλίου
- στα  $1524.45 \text{ cm}^{-1}$ , κορυφή που αποδίδεται στην δόνηση τάσης C=C
- στα  $1344.14 \text{ cm}^{-1}$ , κορυφή που αποδίδεται στην δόνηση τάσης N-O της νιτρο-ομάδας

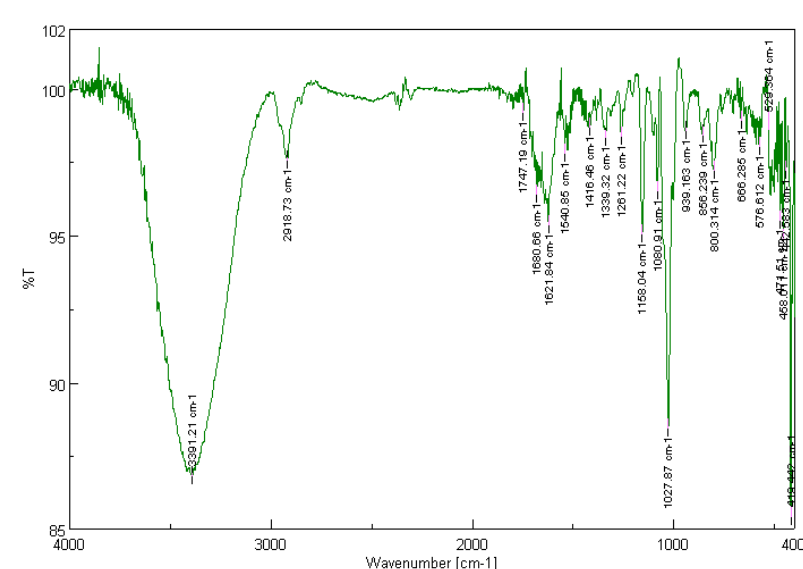
### 3.5.2 Φάσματα β-CD και συμπλόκου Quin-β-CD



Εικόνα 45: Φάσμα FT-IR της β-CD

Από το φάσμα της β-CD, παρατηρείται ότι οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται:

- στα  $3375.78\text{ cm}^{-1}$ , κορυφή που αποδίδεται στην δόνηση τάσης O-H
- στα  $2922.59\text{ cm}^{-1}$ , κορυφή που αποδίδεται στην δόνηση τάσης C-H
- στα  $1636.3\text{ cm}^{-1}$ , κορυφή που αποδίδεται στην ασύμμετρη δόνηση τάσης του  $-\text{CH}_2$
- στα  $1158.04\text{ cm}^{-1}$ , κορυφή που αποδίδεται στην δόνηση κάμψης O-H
- στα  $1027.87\text{ cm}^{-1}$ , κορυφή που αποδίδεται στην δόνηση τάσης C-O των ομάδων των δευτεροταγών αλκοολών



Εικόνα 46: Φάσμα FT-IR του συμπλόκου εγκλεισμού Quin-β-CD (2:1, solvent evaporation & freeze drying)

Στο φάσμα του συμπλόκου παρατηρούνται οι εξής μετατοπίσεις:

- οι κορυφές στα  $3375.78\text{ cm}^{-1}$  και  $2922.59\text{ cm}^{-1}$  που αντιστοιχούν στην β-CD μετατοπίζονται ελαφρώς στα  $3391.21\text{ cm}^{-1}$  και στα  $2918.73\text{ cm}^{-1}$  αντίστοιχα
- η κορυφή της κιναζολινόνης στα  $1689.34\text{ cm}^{-1}$ , η οποία οφείλεται στην δόνηση τάσης C=O, μετατοπίζεται στα  $1680.66\text{ cm}^{-1}$

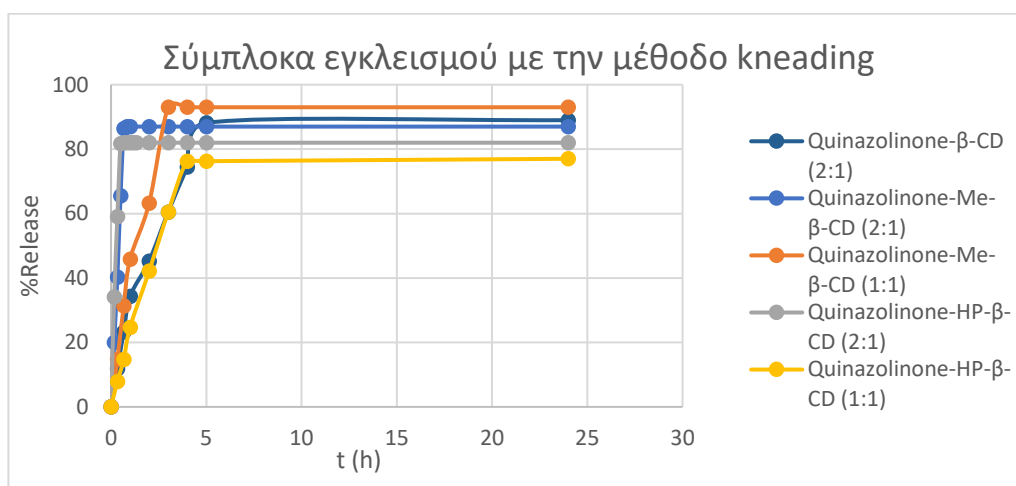
Τέλος, παρατηρείται ότι οι κορυφές  $1158.04\text{ cm}^{-1}$  και  $1027.87\text{ cm}^{-1}$  δεν μετατοπίζονται.

Οι παραπάνω μετατοπίσεις είναι ενδεικτικές των πιθανών αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μεταξύ της κιναζολινόνης και της β-κυκλοδεξτρίνης, γεγονός που συνεπάγεται τον επιτυχή σχηματισμό του συμπλόκου εγκλεισμού. Επίσης, η παρουσία της κορυφής της κιναζολινόνης στο φάσμα του συμπλόκου υποδεικνύει τον σχηματισμό και συμπλόκου μη εγκλεισμού, συμπέρασμα που εξάγεται και από το φάσμα  $^1\text{H NMR}$ .

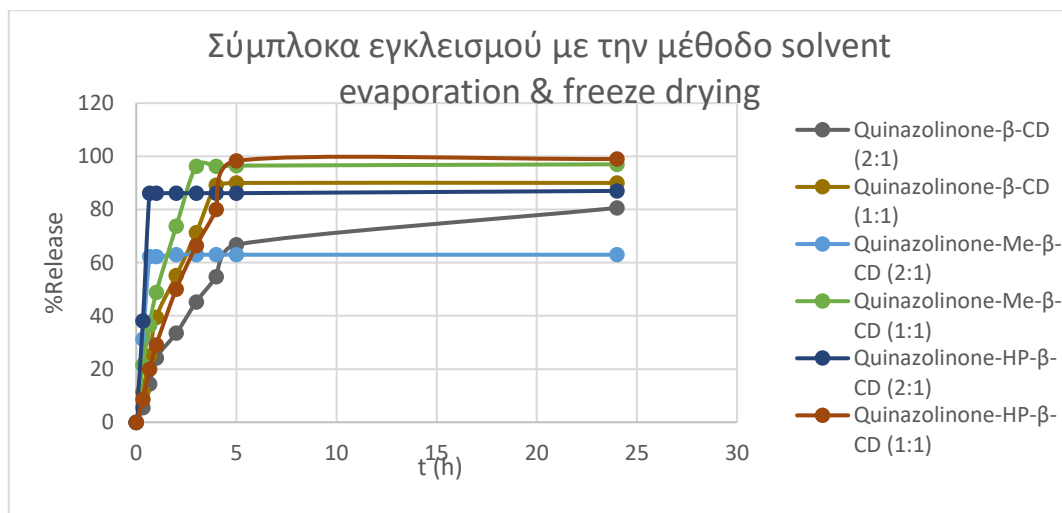


### 3.6 Μελέτη απελευθέρωσης κιναζολινόνης από τα σύμπλοκα εγκλεισμού

Στα ακόλουθα διαγράμματα παρουσιάζονται συγκριτικά τα προφίλ απελευθέρωσης των συμπλόκων Quin-β-CD, Quin-Me-β-CD και Quin-HP-β-CD. Η μελέτη απελευθέρωσης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα  $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$  με pH=7.4 και θερμοκρασία 37°C.



Διάγραμμα 3: Καμπύλες απελευθέρωσης συμπλόκων εγκλεισμού που παρασκευάστηκαν με την μέθοδο kneading



Διάγραμμα 4: Καμπύλες απελευθέρωσης συμπλόκων εγκλεισμού που παρασκευάστηκαν με την μέθοδο solvent evaporation & freeze drying

Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται ότι το προφίλ απελευθέρωσης της εγκλεισμένης κιναζολινόνης από τα σύμπλοκα είναι διφασικό. Αρχικά, παρουσιάζεται μια ταχεία απελευθέρωση («burst effect») στις πρώτες 2 με 4 ώρες, η οποία αρχίζει να σταθεροποιείται («plateau»). Μόνη εξαίρεση αποτελούν τα σύμπλοκα των υποκατεστημένων κυκλοδεξτρινών με αναλογία 2:1 (Quin-Me-β-CD και Quin-HP-β-CD), για τα οποία παρατηρείται πολύ σύντομη και ταχεία απελευθέρωση στα πρώτα 30 με 60 λεπτά.

Πιο συγκεκριμένα, για κάθε σύμπλοκο ισχύει:

Πίνακας 14: *Burst effect* και *plateau* για κάθε σύμπλοκο εγκλεισμού

<b>Quin-β-CD 2:1</b>		
	<i>Kneading</i>	<i>Solvent evaporation &amp; freeze drying</i>
<b>Burst effect</b>	4h, 74%	4h, 54%
<b>Plateau</b>	89%	80%
<b>Quin-β-CD 1:1</b>		
		<i>Solvent evaporation &amp; freeze drying</i>
<b>Burst effect</b>		3h, 71%
<b>Plateau</b>		90%
<b>Quin-Me-β-CD 2:1</b>		
	<i>Kneading</i>	<i>Solvent evaporation &amp; freeze drying</i>
<b>Burst effect</b>	1h, 86%	1h, 62%
<b>Plateau</b>	87%	63%
<b>Quin-Me-β-CD 1:1</b>		
	<i>Kneading</i>	<i>Solvent evaporation &amp; freeze drying</i>
<b>Burst effect</b>	2h, 63%	2h, 74%
<b>Plateau</b>	93%	97%
<b>Quin-HP-β-CD 2:1</b>		
	<i>Kneading</i>	<i>Solvent evaporation &amp; freeze drying</i>
<b>Burst effect</b>	30min, 81%	40min, 86%
<b>Plateau</b>	82%	87%
<b>Quin-HP-β-CD 1:1</b>		
	<i>Kneading</i>	<i>Solvent evaporation &amp; freeze drying</i>
<b>Burst effect</b>	3h, 60%	4h, 80%
<b>Plateau</b>	77%	99%

Κατά το «Burst Effect», η μεγαλύτερη ποσοστιαία απελευθέρωση σημειώνεται στα συμπλοκα Quin-Me-β-CD (2:1, kneading) και Quin-HP-β-CD (2:1, solvent evaporation & freeze drying), όπου απελευθερώνεται το 86% της εγκλεισμένης κιναζολινόνης. Ακολουθούν τα συμπλοκα Quin-HP-β-CD (2:1, kneading) και Quin-HP-β-CD (1:1, solvent evaporation & freeze drying), όπου το 80% της εγκλεισμένης κιναζολινόνης απελευθερώνεται.

Η συνολική μέγιστη ποσοστιαία απελευθέρωση σημειώνεται για το σύμπλοκο Quin-HP-β-CD (1:1, solvent evaporation & freeze drying), όπου το 99% της εγκλεισμένης κιναζολινόνης απελευθερώνεται, ακολουθεί το σύμπλοκο Quin-Me-β-CD (1:1, solvent evaporation & freeze drying) με το 97% της εγκλεισμένης ουσίας να απελευθερώνεται και στην συνέχεια το σύμπλοκο Quin-β-CD (1:1, solvent evaporation & freeze drying), όπου επιτυγχάνεται η απελευθέρωση του 90% της κιναζολινόνης.

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μαθηματική μοντελοποίηση με σκοπό να διαπιστωθεί η κινητική της απελευθέρωσης της κιναζολινόνης από τα σύμπλοκα εγκλεισμού. Τα κινητικά μοντέλα απελευθέρωσης που εφαρμόστηκαν είναι:

- Μηδενικής τάξης (zero order)
- Πρώτης τάξης (first order)
- Higuchi
- Korsmeyer – Peppas

Το βέλτιστο κινητικό μοντέλο που περιγράφει καλύτερα το προφίλ απελευθέρωσης επιλέγεται με βάση τον συντελεστή  $R^2$ .

Πίνακας 15: Συντελεστής  $R^2$  κινητικών μοντέλων για κάθε σύμπλοκο

Σύμπλοκο		Zero order, $R^2$	First order, $R^2$	Higuchi, $R^2$	Korsmeyer – Peppas, $R^2$
Quin-β-CD (2:1)	kneading	0.5393	0.5815	<b>0.9804</b>	<b>0.9927</b>
Quin-Me-β-CD (2:1)		<b>0.9983</b>	0.7863	0.8983	0.9978
Quin-Me-β-CD (1:1)		<b>0.9687</b>	0.5912	0.9582	<b>0.9944</b>
Quin-HP-β-CD (2:1)		<b>0.9905</b>	0.7624	0.9678	0.9844
Quin-HP-β-CD (1:1)		<b>0.9946</b>	0.6985	0.9433	0.9932
Quin-β-CD (2:1)	Solvent evaporation & freeze drying	0.5822	0.663	<b>0.9685</b>	<b>0.9822</b>
Quin-β-CD (1:1)		0.5857	0.6023	<b>0.9681</b>	<b>0.9941</b>
Quin-Me-β-CD (2:1)		<b>1</b>	0.8708	0.9474	0.9995
Quin-Me-β-CD (1:1)		<b>0.984</b>	0.5421	0.9606	<b>0.9874</b>
Quin-HP-β-CD (2:1)		<b>0.9957</b>	0.8817	0.9123	<b>1</b>
Quin-HP-β-CD (1:1)		<b>0.9855</b>	0.6503	0.9659	<b>0.9956</b>

Παρατηρείται ότι οι υψηλότεροι συντελεστές  $R^2$  εμφανίζονται ανά περιπτώσεις για τα μοντέλα μηδενικής κινητικής και Korsmeyer – Peppas. Ωστόσο το μοντέλο Korsmeyer – Peppas είναι ημιεμπειρικό και χρησιμοποιείται για την ανάλυση μόνο του πρώτου 60% των πειραματικών δεδομένων απελευθέρωσης της εγκλεισμένης ουσίας. Γι'αυτόν τον λόγο, λαμβάνεται το κινητικό μοντέλο που εμφανίζει την αμέσως επόμενη καλύτερη γραμμικότητα.

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, το κινητικό μοντέλο που περιγράφει καλύτερα την απελευθέρωση της εγκλεισμένης ουσίας από τα σύμπλοκα Quin-β-CD είναι το Higuchi, ενώ για τα σύμπλοκα Quin-Me-β-CD και Quin-HP-β-CD είναι το μοντέλο μηδενικής τάξης.

Επίσης, μέσω της τιμής του εκθέτη  $n$  της εξίσωσης του ημιεμπειρικού μοντέλου Korsmeyer – Peppas βρίσκεται ο μηχανισμός απελευθέρωσης της κιναζολινόνης για κάθε σύμπλοκο.

Πίνακας 16: Εξισώσεις του μοντέλου Korsmeyer – Peppas και μηχανισμοί απελευθέρωσης για κάθε σύμπλοκο εγκλεισμού

Σύμπλοκο		Korsmeyer – Peppas, R <sup>2</sup>	Εξίσωση	Εκθέτης n	Μηχανισμός απελευθέρωσης
Quin-β-CD (2:1)	kneading	0.9927	$\gamma=0.7818x+0.0482$	0.7818	Μη Fickian διάχυση
Quin-Me-β-CD (2:1)		0.9978	$\gamma=1.2166x+0.0227$	1.2166	Super Case II
Quin-Me-β-CD (1:1)		0.9944	$\gamma=0.8805x+0.0266$	0.8805	Μη Fickian διάχυση
Quin-HP-β-CD (2:1)		0.9844	$\gamma=1.3286x+0.0494$	1.3286	Super Case II
Quin-HP-β-CD (1:1)		0.9932	$\gamma=0.7994x-0.0518$	0.7994	Μη Fickian διάχυση
Quin-β-CD (2:1)	Solvent evaporation & freeze drying	0.9822	$\gamma=0.7553x-0.0562$	0.7553	Μη Fickian διάχυση
Quin-β-CD (1:1)		0.9941	$\gamma=0.8249x+0.0253$	0.8249	Μη Fickian διάχυση
Quin-Me-β-CD (2:1)		0.9995	$\gamma=1.129x+0.0043$	1.129	Super Case II
Quin-Me-β-CD (1:1)		0.9874	$\gamma=0.8898x+0.06687$	0.8898	Μη Fickian διάχυση
Quin-HP-β-CD (2:1)		1	$\gamma=1.2102x+0.0011$	1.2102	Super Case II
Quin-HP-β-CD (1:1)		0.9956	$\gamma=0.8161x-0.0252$	0.8161	Μη Fickian διάχυση

Προκύπτει ότι ο μηχανισμός απελευθέρωσης της εγκλεισμένης κινιζολινόνης από τα σύμπλοκα Quin-β-CD, Quin-Me-β-CD (αναλογίας 1:1) και Quin-HP-β-CD (αναλογίας 1:1) είναι η μη Fickian διάχυση, ενώ για τα σύμπλοκα Quin-Me-β-CD (αναλογίας 2:1) και Quin-HP-β-CD (αναλογίας 2:1) είναι ο μηχανισμός Super Case II.

Κατά την μη Fickian διάχυση τα φαινόμενα διάχυσης και διόγκωσης είναι ισοδύναμα, ενώ κατά τον μηχανισμό Super Case II συμβαίνει χαλάρωση και διάβρωση του πολυμερικού συστήματος.

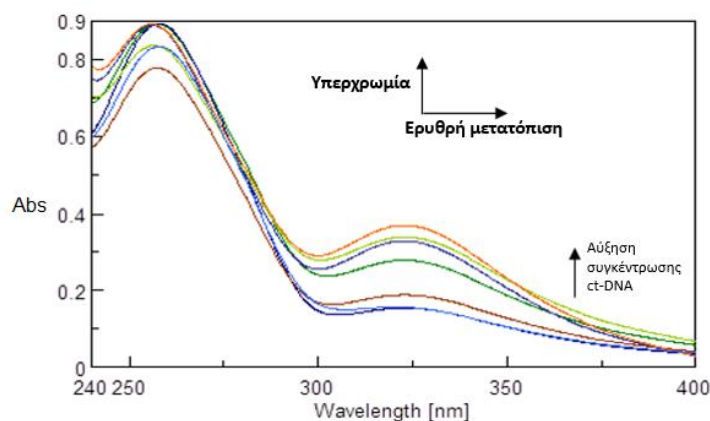
## 3.7 Αλληλεπίδραση DNA

### 3.7.1 Μελέτη αλληλεπίδρασης DNA μέσω τιτλοδότησης UV-Vis

Για την μελέτη αλληλεπίδρασης με το DNA, πραγματοποιήθηκαν τιτλοδοτήσεις υπεριώδους – ορατού για διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA. Τα φάσματα που προέκυψαν μελετώνται τόσο ως προς τη μεταβολή της απορρόφησης όσο και ως προς τη μεταβολή του μήκους κύματος στο οποίο σημειώνεται η μέγιστη απορρόφηση,  $\lambda_{\max}$ . Έτσι συμπεραίνεται το είδος της αλληλεπίδρασης και ταυτόχρονα διαπιστώνεται εάν το DNA σταθεροποιείται ή αποσταθεροποιείται. Ακόμα, υπολογίζεται η σταθερά σύνδεσης με το ct-DNA  $K_b$ , με βάση την εξίσωση Benesi– Hildebrand.

Από τις μεταβολές απορρόφησης και μήκους κύματος  $\lambda_{\max}$ , εξάγονται πληροφορίες για το είδος της αλληλεπίδρασης. Συγκεκριμένα, αύξηση της απορρόφησης κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του DNA (υπερχρωμία) υποδηλώνει εξωτερική συναρμογή στην αύλακα του DNA. Αντιθέτως, μείωση της απορρόφησης κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του DNA υποδηλώνει παρεμβολή της ένωσης μεταξύ βάσεων του DNA. Παράλληλα, μετατόπιση του  $\lambda_{\max}$  προς μικρότερα μήκη κύματος (κυανή μετατόπιση ή υψοχρωμία) υποδηλώνει αποσταθεροποίηση της ελικοειδούς δομής του DNA, ενώ μετατόπιση του  $\lambda_{\max}$  προς μεγαλύτερα μήκη κύματος (ερυθρή μετατόπιση ή βαθυχρωμία) υποδηλώνει σταθεροποίηση της δομής του DNA.

Αρχικά, μελετήθηκε η καθαρή κιναζολινόνη και προέκυψε το παρακάτω φάσμα (Εικόνα 47).



Εικόνα 47: Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων καθαρής κιναζολινόνης συγκέντρωσης 10  $\mu\text{M}$  σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA (0-100  $\mu\text{M}$ )

Παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης για αύξηση της συγκέντρωσης του ct-DNA (υπερχρωμία) και παράλληλα μετατόπιση του  $\lambda_{\max}$  προς μεγαλύτερα μήκη κύματος (ερυθρή μετατόπιση), γεγονός που υποδηλώνει εξωτερική συναρμογή της ένωσης και σταθεροποίηση της ελικοειδούς δομής του DNA μέσω της αλληλεπίδρασης με την 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτροκιναζολινόνη. Η τιμή της σταθεράς  $K_b$  όπως προέκυψε από την εξίσωση Benesi – Hildebrand βρέθηκε ίση με:  $K_b = 2,26 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ .

Για να διαπιστωθεί η ισχύς της σύνδεσης με το DNA, συγκρίθηκε η τιμή  $K_b$  της κιναζολινόνης με την  $K_b$  της πρότυπης ένωσης Methyl Green η οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία

εμφανίζει σύνδεση με το DNA. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία για την Methyl Green και προέκυψε τιμή  $K_b=7.33 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Από τη σύγκριση των δύο τιμών  $K_b$  προκύπτει ότι η κινναζολινόνη εμφανίζει ασθενέστερη σύνδεση με το DNA από ότι η Methyl Green αλλά είναι συγκρίσιμη.

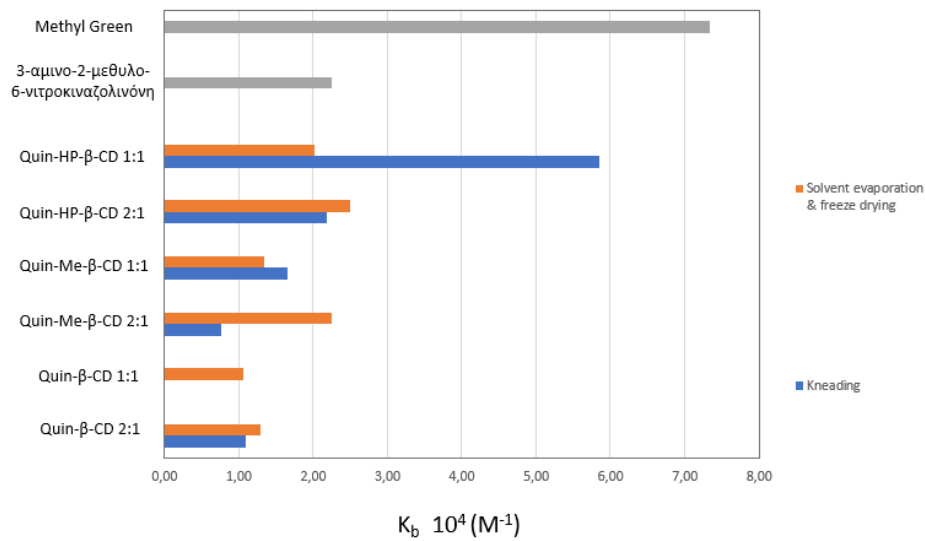
Ακολούθως, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των κυκλοδεξτρινών με το DNA, οι οποίες αναμένεται να εμφανίσουν ασθενή σύνδεση. Αυτό το γεγονός επιβεβαιώθηκε και πειραματικά, καθώς από τα φάσματα τιτλοδότησης UV-Vis παρατηρήθηκαν χαμηλότερες μεταβολές της απορρόφησης και του  $\lambda_{\max}$  στις διάφορες συγκεντρώσεις του DNA και παράλληλα χαμηλότερες τιμές  $K_b$ .

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των συμπλόκων εγκλεισμού με το DNA. Όμως, η ένωση που είναι επιθυμητό να αλληλεπιδρά με το DNA είναι η 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτροκινναζολινόνη. Γι'αυτό, αρχικά τα διαλύματα των συμπλόκων αφέθηκαν να επωασθούν για επιπλέον χρόνο με βάση τα αποτελέσματα των κινητικών απελευθέρωσης, ώστε να απελευθερωθεί η κατάλληλη ποσότητα της ένωσης και στην συνέχεια επώαστηκαν με το DNA. Οι συνθήκες επώασης με το DNA είναι οι ίδιες με τη μελέτη της απελευθέρωσης της κινναζολινόνης ( $\text{pH}=7.4$ ,  $T=37^\circ\text{C}$ ). Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες αναμειξεις με διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων DNA έτσι ώστε στα τελικά διαλύματα, η συγκέντρωση της κινναζολινόνης να είναι κάθε φορά ίδια με αυτή των διαλυμάτων καθαρής κινναζολινόνης (10  $\mu\text{M}$ ) και να μπορούν τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα.

Επίσης, υπολογίστηκαν οι σταθερές αλληλεπίδρασης  $K_b$  από την εξίσωση Benesi – Hildebrand για τα διαλύματα των συμπλόκων. Οι τιμές συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 17: Σταθερές αλληλεπίδρασης  $K_b$

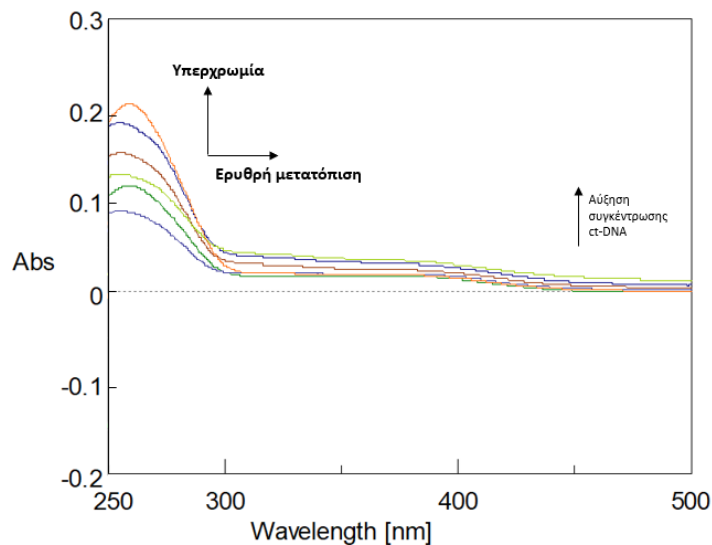
Ένωση / Σύμπλοκο	$K_b \cdot 10^4 \text{ (M}^{-1}\text{)}$
Methyl Green	7.33
3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτροκινναζολινόνη	2.26
Quin- $\beta$ -CD (2:1, kneading)	1.10
Quin-Me- $\beta$ -CD (2:1, kneading)	0.77
Quin-Me- $\beta$ -CD (1:1, kneading)	1.66
Quin-HP- $\beta$ -CD (2:1, kneading)	2.19
Quin-HP- $\beta$ -CD (1:1, kneading)	<b>5.86</b>
Quin- $\beta$ -CD (2:1, solv. evap. & fr. drying)	1.29
Quin- $\beta$ -CD (1:1, solv. evap. & fr. drying)	1.06
Quin-Me- $\beta$ -CD (2:1, solv. evap. & fr. drying)	2.26
Quin-Me- $\beta$ -CD (1:1, solv. evap. & fr. drying)	1.35
Quin-HP- $\beta$ -CD (2:1, solv. evap. & fr. drying)	<b>2.50</b>
Quin-HP- $\beta$ -CD (1:1, solv. evap. & fr. drying)	2.02



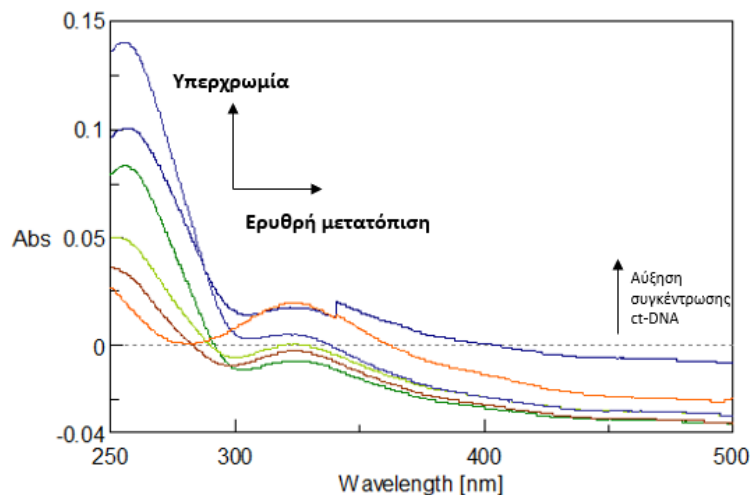
Διάγραμμα 5: Συγκριτικό διάγραμμα σταθερών αλληλεπίδρασης  $K_b$

Συγκρίνοντας τις τιμές  $K_b$  των συμπλόκων εγκλεισμού με την καθαρή κιναιζολινόνη, παρατηρείται ότι ορισμένα σύμπλοκα εμφανίζουν μεγαλύτερη τιμή σταθεράς και συνεπώς ισχυρότερη αλληλεπίδραση. Πιο συγκεκριμένα, τα σύμπλοκα αυτά είναι: Quin-HP-β-CD (1:1, kneading) και Quin-HP-β-CD (2:1, solvent evaporation & freeze drying). Ακόμα, τα σύμπλοκα Quin-Me-β-CD (2:1) και Quin-HP-β-CD (1:1) της μεθόδου solvent evaporation & freeze drying και το σύμπλοκο Quin-HP-β-CD (2:1, kneading) παρουσιάζουν σχεδόν ίδιες τιμές σταθεράς αλληλεπίδρασης με την ελεύθερη κιναιζολινόνη.

Παρακάτω παρουσιάζονται ενδεικτικά τα φάσματα UV-Vis των συμπλόκων όπου η απελευθερωμένη κιναιζολινόνη εμφάνισε ισχυρή αλληλεπίδραση με το ct-DNA.



Εικόνα 48: Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Quin-HP-β-CD (1:1, kneading) με συγκέντρωση απελευθερωμένης κιναιζολινόνης 10  $\mu\text{M}$  σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA, σταθερά  $K_b=5.86 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$



Εικόνα 49: Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Quin-HP-β-CD (2:1, solvent evaporation & freeze drying) με συγκέντρωση απελευθερώμενης κιναζολινόνης 10  $\mu\text{M}$  σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA, σταθερά  $K_b=2.50 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$

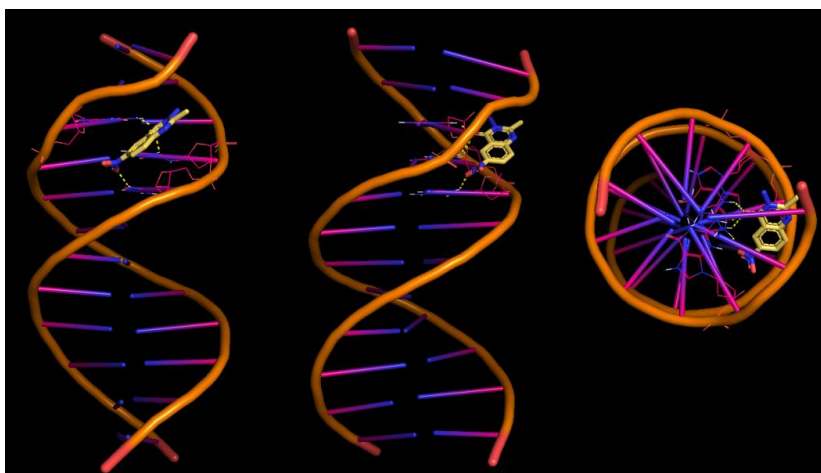
Στα παραπάνω φάσματα παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης για αύξηση της συγκέντρωσης του ct-DNA (υπερχρωμία) και παράλληλα μετατόπιση του  $\lambda_{\text{max}}$  προς μεγαλύτερα μήκη κύματος (ερυθρή μετατόπιση), γεγονός που υποδηλώνει εξωτερική συναρμογή της ένωσης και σταθεροποίηση της ελικοειδούς δομής του DNA όπως ακριβώς και στη περίπτωση της ελεύθερης κιναζολινόνης. Στις συγκεκριμένες περιπτώσεις, η αλληλεπίδραση της απελευθερώμενης κιναζολινόνης με το DNA είναι ισχυρότερη από την αλληλεπίδραση που εμφανίζει η ελεύθερη ένωση.

Τα φάσματα των υπόλοιπων συμπλόκων παρουσίασαν, επίσης, υπερχρωμία και ερυθρή μετατόπιση και παρουσιάζονται στο Παράρτημα Εικόνων.

### 3.7.2 Υπολογιστική μελέτη αλληλεπίδρασης με το DNA

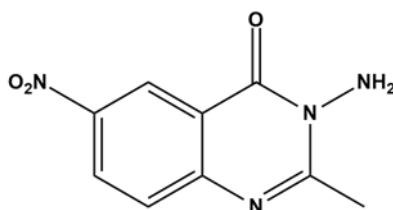
Η αλληλεπίδραση της κιναζολινόνης με το DNA μελετήθηκε και με την χρήση υπολογιστικών εργαλείων (molecular docking). Μέσω του προγράμματος PyMol, απεικονίζεται η δέσμευση της 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτροκιναζολιν-4(3H)-όνης στην κρυσταλλική δομή του DNA, απεικονίζοντας την σταθεροποίησή της στην μικρή αύλακα (minor groove) του DNA (PDB ID: 1bna).





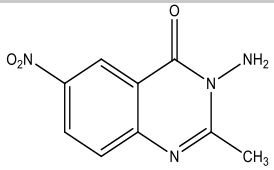
Εικόνα 50: Απεικόνιση μέσω PyMol της δέσμευσης της κιναζολινόνης στην μικρή αύλακα του DNA. Με κίτρινες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου με τα νουκλεοτίδια.

Η μικρή αύλακα όντας μικρότερη σε μέγεθος από την μεγάλη πλεονεκτεί στην δέσμευση μικρών μορίων. Οι περισσότερες εκ των αντικαρκινικών και φαρμακευτικών ουσιών είναι μικρά μόρια, με αποτέλεσμα η μικρή αύλακα να καθίσταται πολύ σημαντική ως κύρια θέση δέσμευσής τους. Η σταθεροποίηση του συμπλόκου επιτυγχάνεται με το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου (Εικόνα 50), πολικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Από τους τέσσερις δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των νουκλεοτιδίων DA-17, DG-10 και DG-16, τρεις δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μεταξύ του οξυγόνου της καρβonyλομάδας και των πουρινών των αζωτούχων βάσεων των νουκλεοτιδίων DA-17, DG-10 και DG-16. Τέλος, σχηματίζεται ένας δεσμός υδρογόνου μεταξύ της νιτρο- ομάδας του αρωματικού δακτυλίου και της πουρίνης του νουκλεοτιδίου DA-17.



Εικόνα 51: 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτροκιναζολιν-4(3H)-όνη

Πίνακας 18: Ενέργεια αλληλεπίδρασης κιναζολινόνης- DNA, αριθμός δεσμών υδρογόνου και τα νουκλεοτίδια που συμμετέχουν σε αυτούς

Κιναζολινόνη	Ενέργεια Αλληλεπίδρασης (Binding Energy) (kcal/mol)	Αριθμός δεσμών υδρογόνου	Νουκλεοτίδια
	-7.2	4	DG-10 DG-16 DA-17

## 4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε επιτυχής εγκλεισμός της 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτροκινολιν-4(3H)-όνης στην β-κυκλοδεξτρίνη, καθώς και σε δύο τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες, μεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη και 2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη. Τα σύμπλοκα εγκλεισμού παρασκευάστηκαν με δύο μεθόδους: την μέθοδο υγρής λειοτρίβησης με σχηματισμό πάστας και την συνδυαστική μέθοδο εξάτμισης διαλύτη και λυοφιλιοποίησης.

Τα σύμπλοκα συγκρίθηκαν ως προς τις αποδόσεις διεργασίας και εγκλεισμού και παρουσίασαν ικανοποιητικές αποδόσεις διεργασίας (67% - 90%) και εγκλεισμού (51% - 87%) και με τις δύο μεθόδους.

Ακόμα, τα σύμπλοκα εγκλεισμού μελετήθηκαν ως προς το μέγεθος τους, την διασπορά τους και την σταθερότητα τους. Το μέγεθος των συμπλόκων κρίθηκε ικανοποιητικό ενώ ο δείκτης πολυδιασποράς επιβεβαίωσε την ομοιόμορφη κατανομή του μεγέθους. Επίσης, οι υψηλές (κατ' απόλυτη τιμή) τιμές ζ-δυναμικού υποδεικνύουν σταθερές διασπορές των συμπλόκων χωρίς τάση προς συσσωμάτωση. Εξαιρέση αποτελούν τα σύμπλοκα με τη μεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη που παρασκευάστηκαν μέσω υγρής λειοτρίβησης, τα οποία παρουσίασαν χαμηλές (κατ' απόλυτη τιμή) τιμές ζ-δυναμικού.

Αναφορικά με την δομή τους, τα σύμπλοκα μελετήθηκαν μέσω της φασματοσκοπίας NMR και FT-IR, τα φάσματα των οποίων επιβεβαίωσαν την παρουσία αλληλεπιδράσεων μεταξύ της κινολινόνης και των κυκλοδεξτρινών.

Παράλληλα, προέκυψε ότι το προφίλ απελευθέρωσης της κινολινόνης από τα σύμπλοκα εγκλεισμού είναι διφασικό. Αρχικά, εντοπίζεται μια ταχεία απελευθέρωση («burst effect»), η οποία σταθεροποιείται («plateau»). Το burst effect κυμαίνεται σε ένα εύρος από 2 έως 4 ώρες. Εξαιρέση αποτελούν τα σύμπλοκα τροποποιημένων κυκλοδεξτρινών αναλογίας 2:1, στα οποία παρατηρείται σε αρκετά μικρό χρονικό διάστημα σχεδόν ολική απελευθέρωση της εγκλεισμένης κινολινόνης.

Κατά την κινητική μοντελοποίηση της απελευθέρωσης, προέκυψε ότι το μοντέλο που περιγράφει καλύτερα το προφίλ απελευθέρωσης της κινολινόνης από τα σύμπλοκα εγκλεισμού με τις υποκατεστημένες κυκλοδεξτρίνες είναι το μοντέλο μηδενικής τάξης, ενώ όσον αφορά τα σύμπλοκα της β-κυκλοδεξτρίνης, το κινητικό μοντέλο της απελευθέρωσης της κινολινόνης είναι το Higuchi.

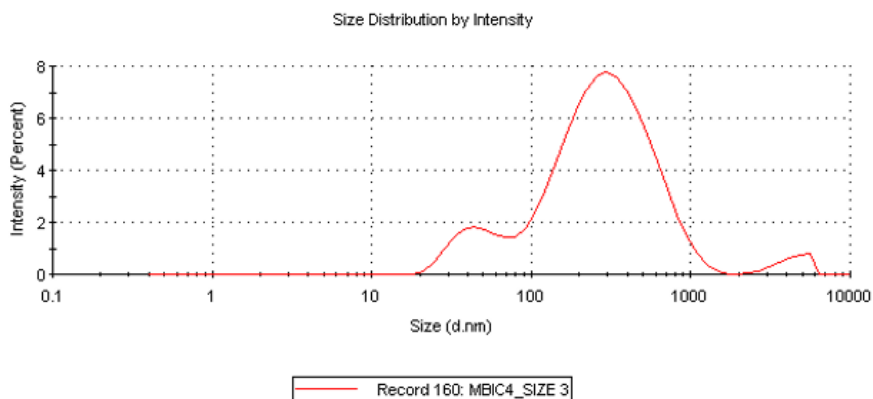
Τέλος, κατά την μελέτη αλληλεπίδρασης με το ct-DNA παρατηρήθηκε τόσο στην κινολινόνη όσο και στα σύμπλοκα εγκλεισμού εξωτερική αλληλεπίδραση με το DNA. Πιο συγκεκριμένα, η ελεύθερη κινολινόνη αλληλεπιδρά με το ct-DNA μέσω εξωτερικής συναρμογής και το σταθεροποιεί. Εξωτερική συναρμογή και σταθεροποίηση του ct-DNA παρατηρήθηκε και για την απελευθερώμενη κινολινόνη από τα σύμπλοκα, σε ορισμένες περιπτώσεις με ισχυρότερη αλληλεπίδραση. Παράλληλα, μέσω της μελέτης *in silico* παρατηρήθηκε η εξωτερική συναρμογή της 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτροκινολινόνης στην μικρή αύλακα της διπλής έλικας του DNA.

## 5. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

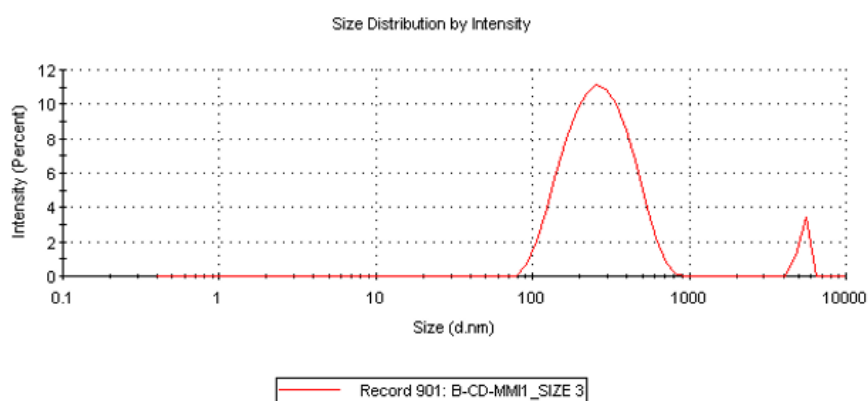
Από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας προκύπτουν οι παρακάτω προτάσεις για πιθανή μελλοντική έρευνα.

- Διερεύνηση μελέτης της σύνθεσης διάφορων κινιζολινικών αναλόγων και του εγκλεισμού τους σε β-κυκλοδεξτρίνες. Η μελέτη αυτή θα συμβάλλει στην αναζήτηση πιθανών ενώσεων οδηγών και στην εξέλιξη των βιολογικών τους δράσεων.
- Μελέτη επικάλυψης των συμπλόκων εγκλεισμού με βιοπολυμερή, με σκοπό την τροποποίηση της επιφάνειάς τους και την περαιτέρω βελτίωσή τους αναφορικά με την φυσικοχημική σταθερότητά τους, γεγονός που επηρεάζει και την αποδέσμευση της εγκλεισμένης κινιζολινόνης.
- Όσον αφορά την μελέτη της βιολογικής δράσης της κινιζολινόνης και των συμπλόκων, απαιτείται πιο εκτεταμένη έρευνα της αλληλεπίδρασης των παραπάνω μορίων με το ct-DNA χρησιμοποιώντας επιπλέον μεθόδους, όπως μελέτη της ανταγωνιστικής δράσης με το βρωμιούχο αιθίδιο με φασματοσκοπία φθορισμού, ιξωδομετρία κ.ά.
- Επίσης, είναι καίριας σημασίας η εκτεταμένη μελέτη της φωτοδιασπαστικής ικανότητας των συμπλόκων εγκλεισμού που συντέθηκαν, καθώς η ίδια η κινιζολινόνη έχει ήδη μελετηθεί και παρουσιάζει υψηλά ποσοστά φωτοδιασπαστικής δράσης.
- Τέλος, ενδιαφέρον θα ήταν η δοκιμή και άλλων υποκατεστημένων β-κυκλοδεξτρινών ως φορείς εγκλεισμού, πέρα από την μεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνη και 2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη και η μελέτη της επιρροής των υποκαταστατών τους στην αλληλεπίδραση των συμπλόκων με το ct-DNA.

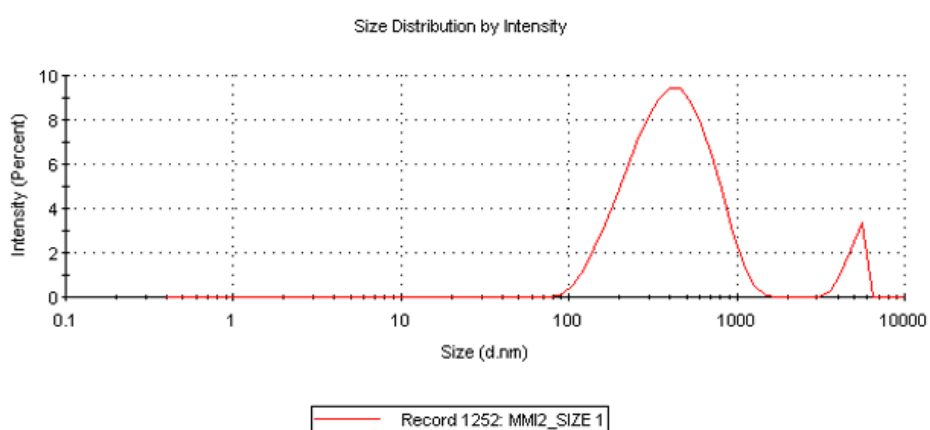
## Παράρτημα Εικόνων



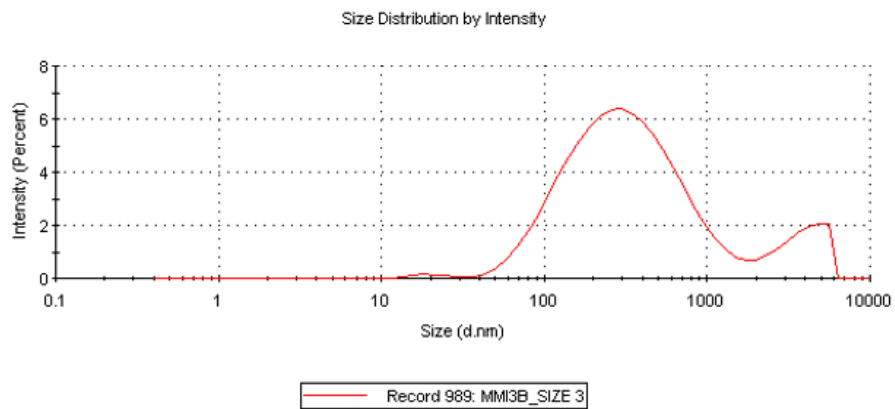
Εικόνα 52: Κατανομή μεγέθους συμπλόκου Quin- $\beta$ -CD (2:1, kneading)



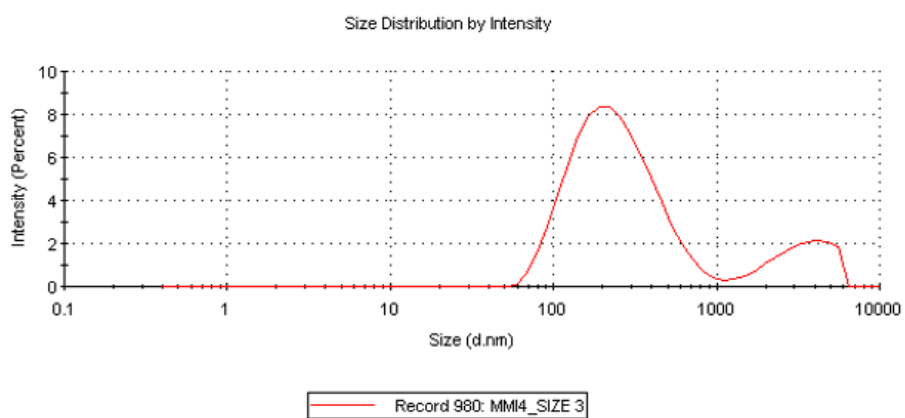
Εικόνα 53: Κατανομή μεγέθους συμπλόκου Quin-Me- $\beta$ -CD (2:1, kneading)



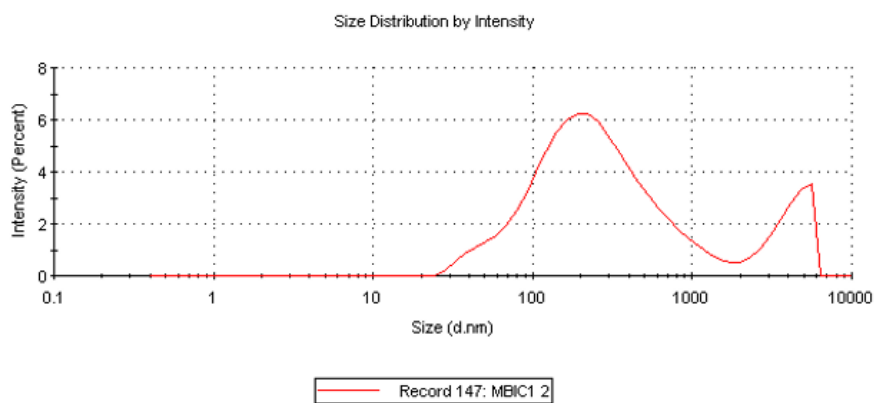
Εικόνα 54: Κατανομή μεγέθους συμπλόκου Quin-Me- $\beta$ -CD (1:1, kneading)



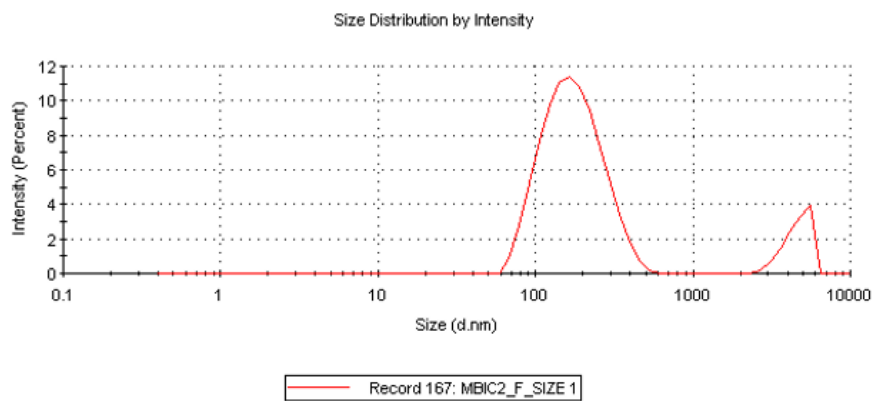
Εικόνα 55: Κατανομή μεγέθους συμπλόκου Quin-HP-β-CD (2:1, kneading)



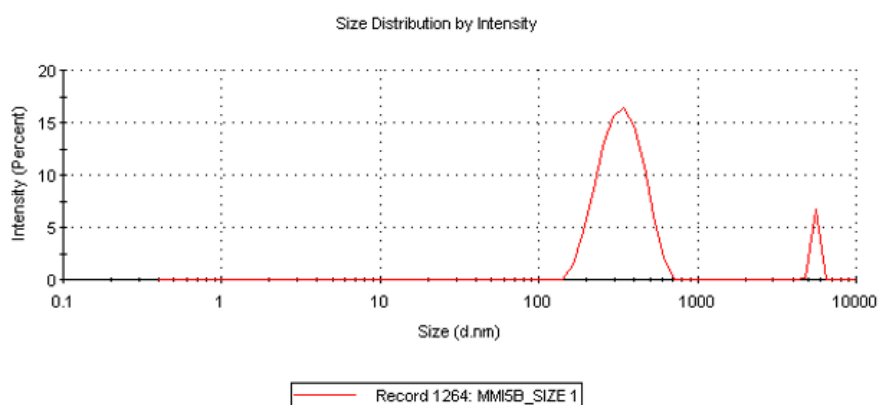
Εικόνα 56: Κατανομή μεγέθους συμπλόκου Quin-HP-β-CD (1:1, kneading)



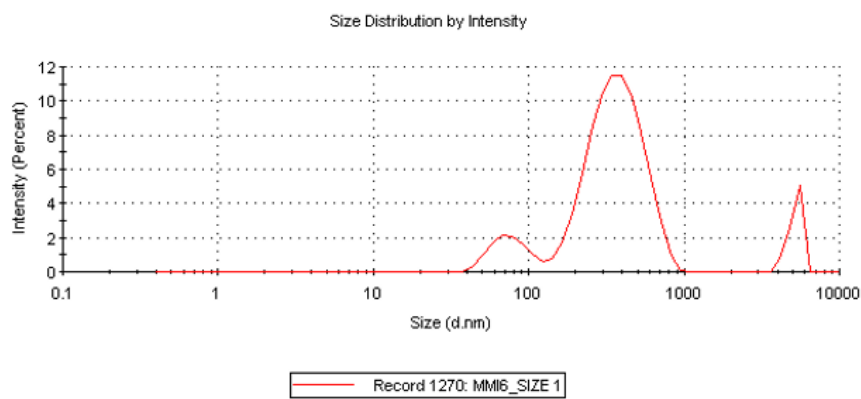
Εικόνα 57: Κατανομή μεγέθους συμπλόκου Quin-β-CD (2:1, solvent evaporation & freeze drying)



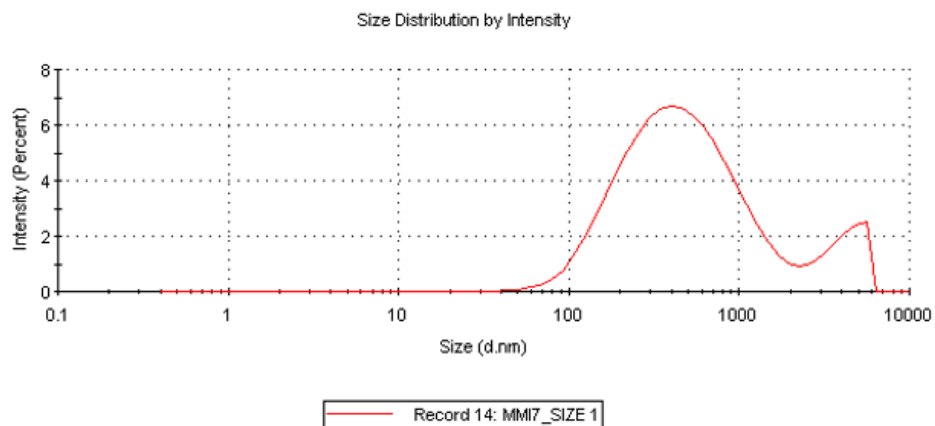
Εικόνα 58: Κατανομή μεγέθους συμπλόκου Quin-β-CD (1:1, solvent evaporation & freeze drying)



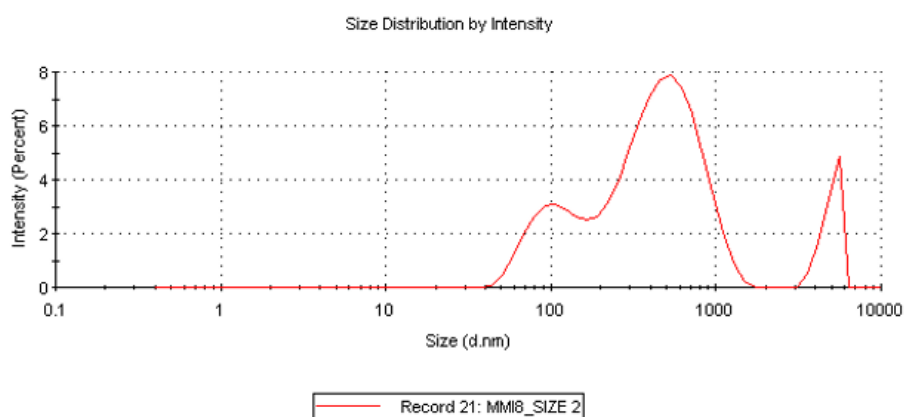
Εικόνα 59: Κατανομή μεγέθους συμπλόκου Quin-Me-β-CD (2:1, solvent evaporation & freeze drying)



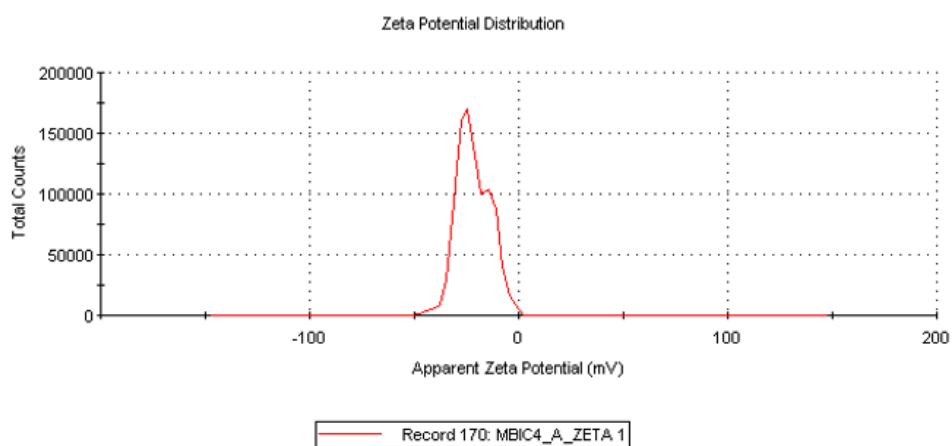
Εικόνα 60: Κατανομή μεγέθους συμπλόκου Quin-Me-β-CD (1:1, solvent evaporation & freeze drying)



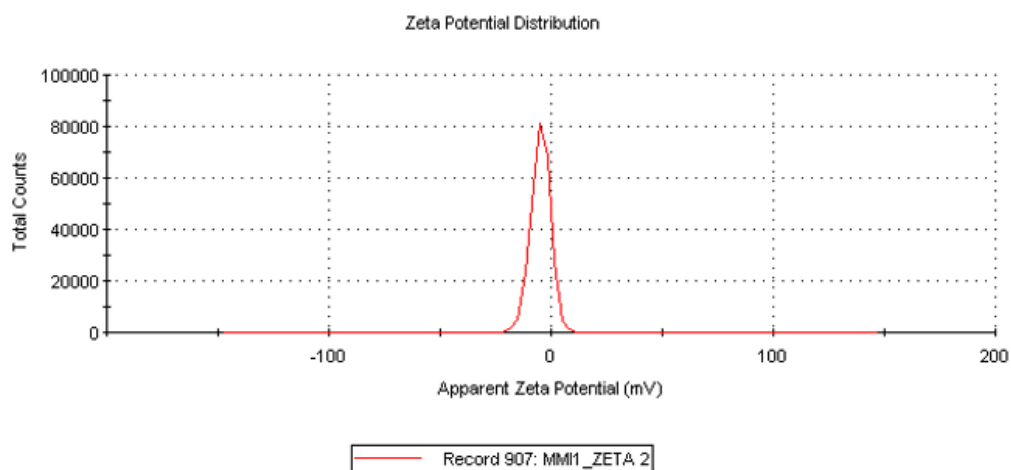
Εικόνα 61: Κατανομή μεγέθους συμπλόκου Quin-HP-β-CD (2:1, solvent evaporation & freeze drying)



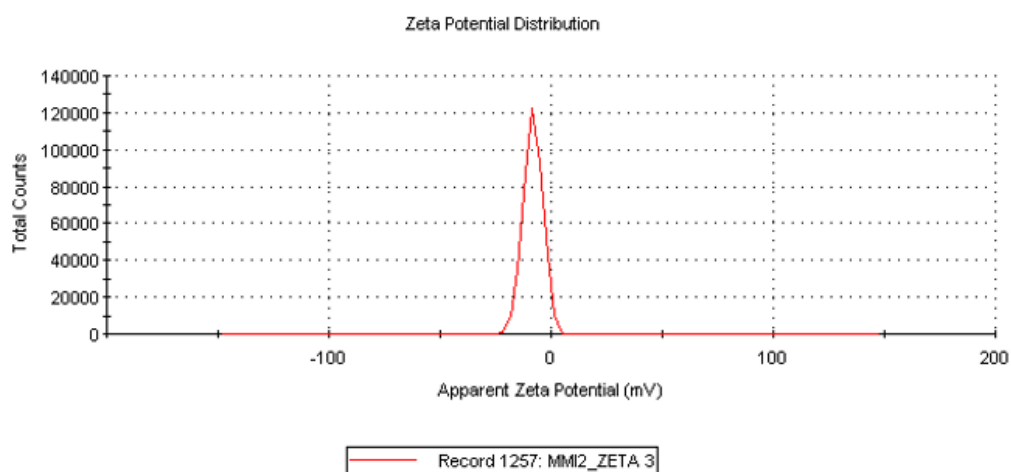
Εικόνα 62: Κατανομή μεγέθους συμπλόκου Quin-HP-β-CD (1:1, solvent evaporation & freeze drying)



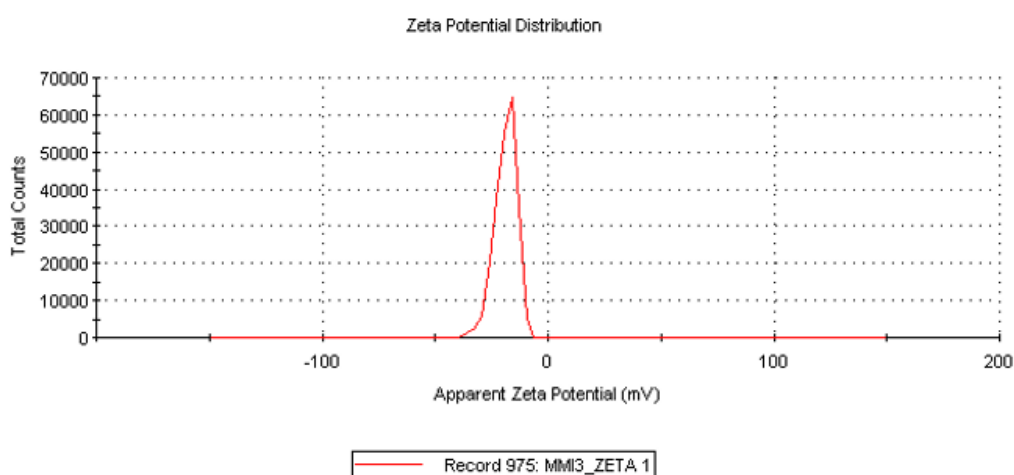
Εικόνα 63: ζ-δυναμικό συμπλόκου Quin-β-CD (2:1, kneading)



Εικόνα 64: ζ-δυναμικό συμπλόκου Quin-Me-β-CD (2:1, kneading)

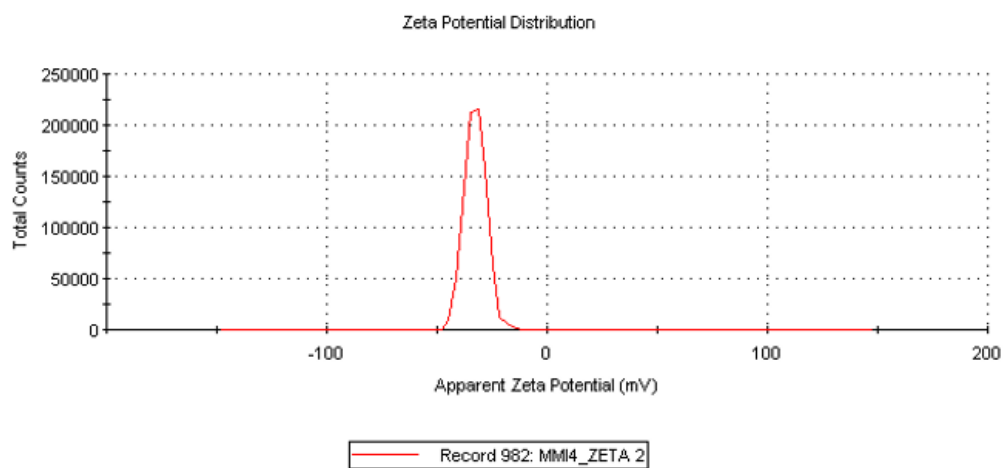


Εικόνα 65: ζ-δυναμικό συμπλόκου Quin-Me-β-CD (1:1, kneading)

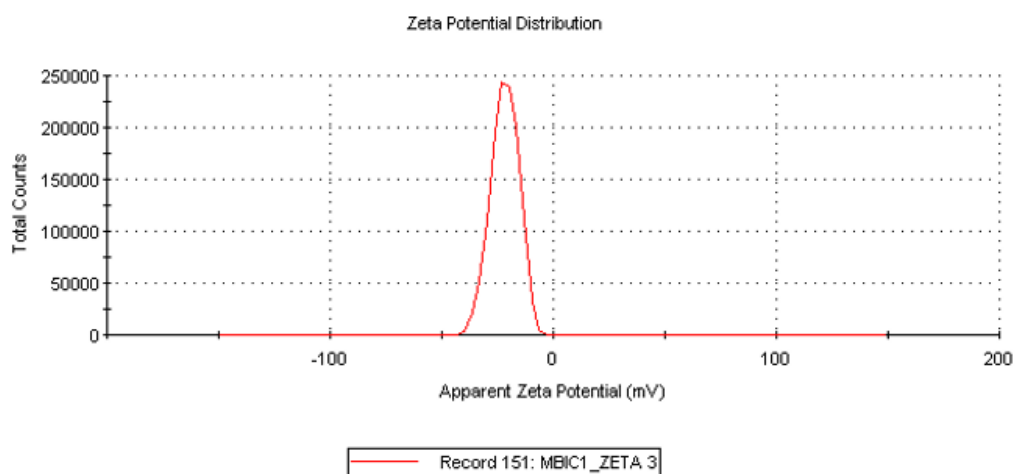


Εικόνα 66: ζ-δυναμικό συμπλόκου Quin-HP-β-CD (2:1, kneading)

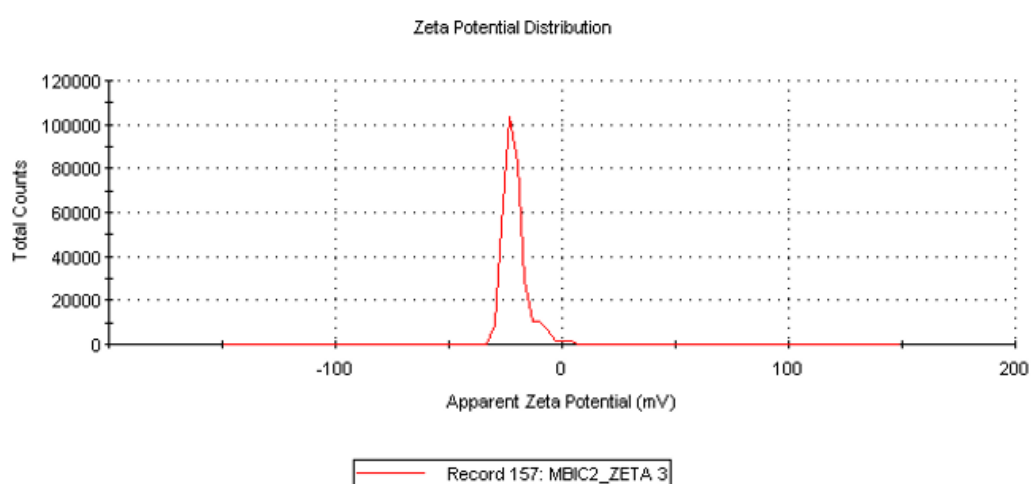




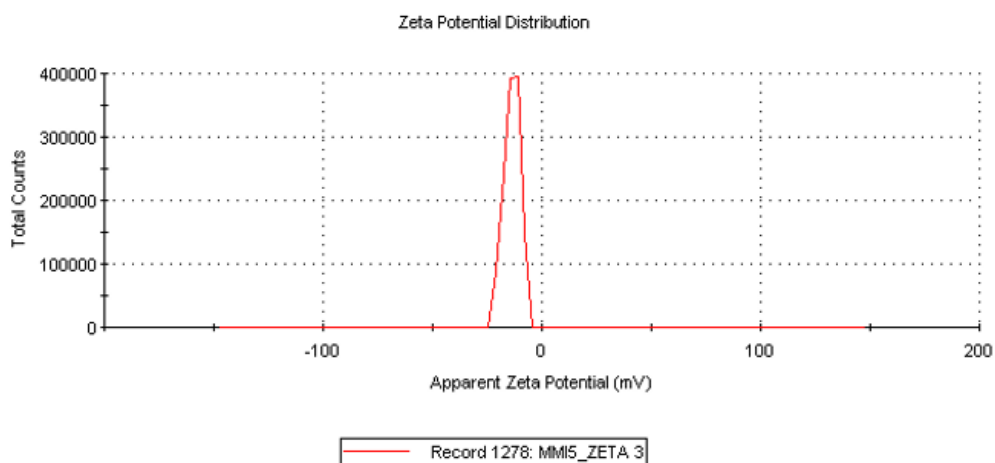
Εικόνα 67: ζ-δυναμικό συμπλόκου Quin-HP-β-CD (1:1, kneading)



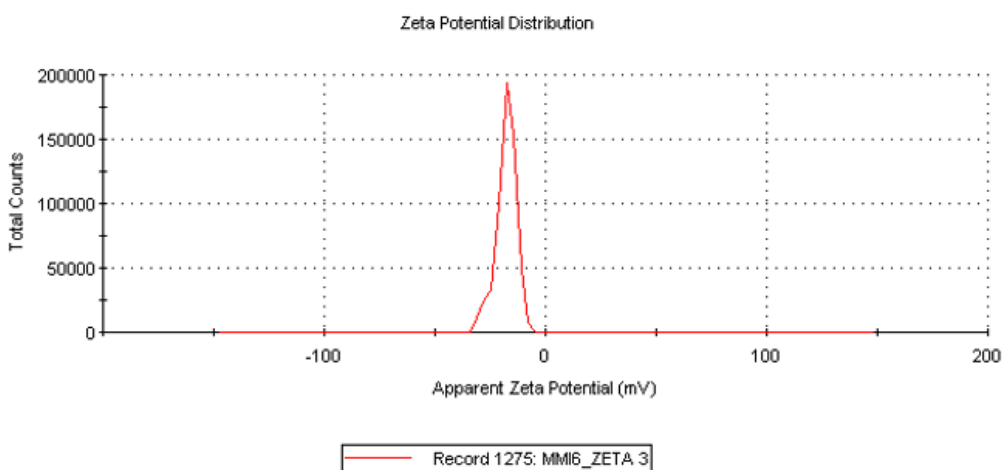
Εικόνα 68: ζ-δυναμικό συμπλόκου Quin-β-CD (2:1, solvent evaporation & freeze drying)



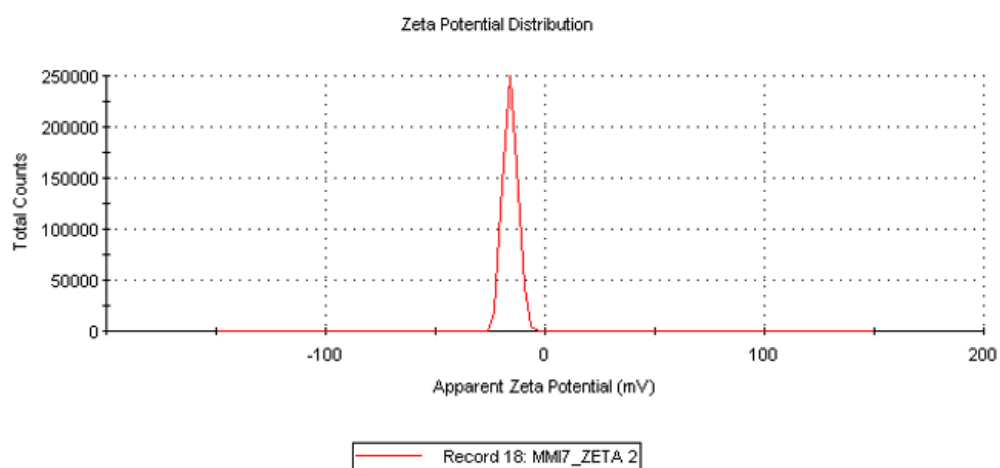
Εικόνα 69: ζ-δυναμικό συμπλόκου Quin-β-CD (1:1, solvent evaporation & freeze drying)



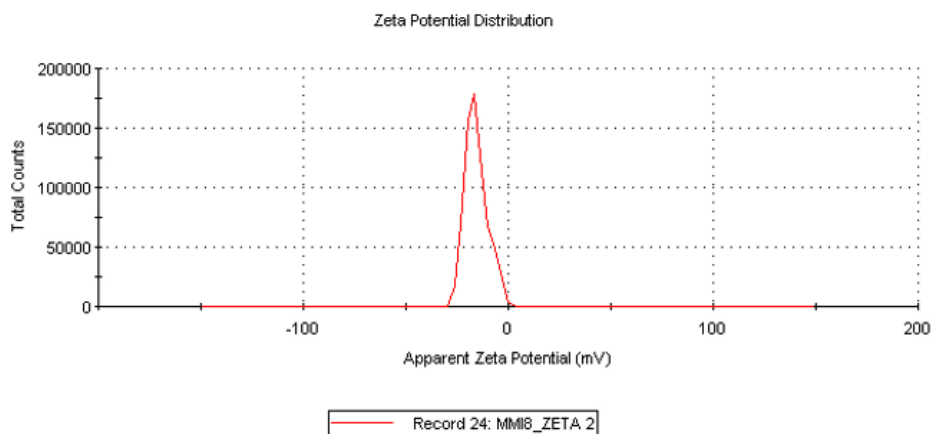
Εικόνα 70: ζ-δυναμικό συμπλόκου Quin-Me-β-CD (2:1, solvent evaporation & freeze drying)



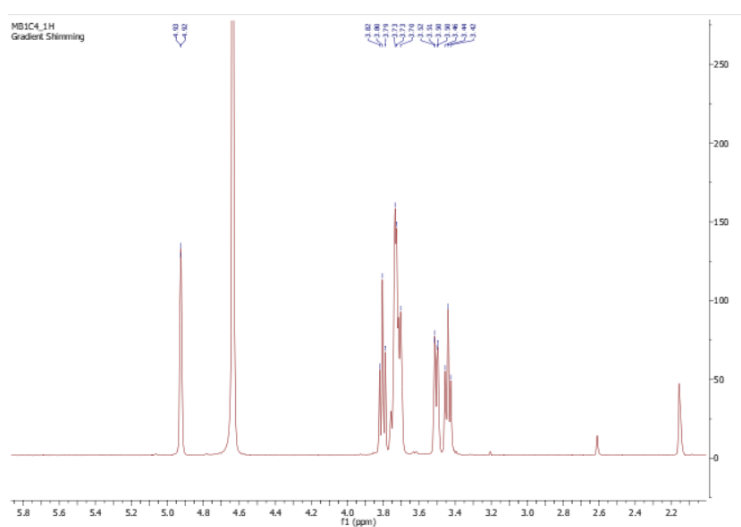
Εικόνα 71: ζ-δυναμικό συμπλόκου Quin-Me-β-CD (1:1, solvent evaporation & freeze drying)



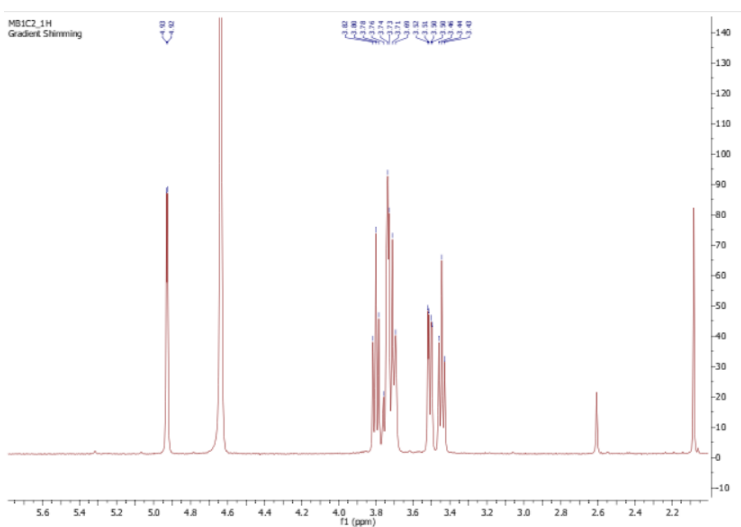
Εικόνα 72: ζ-δυναμικό συμπλόκου Quin-HP-β-CD (2:1, solvent evaporation & freeze drying)



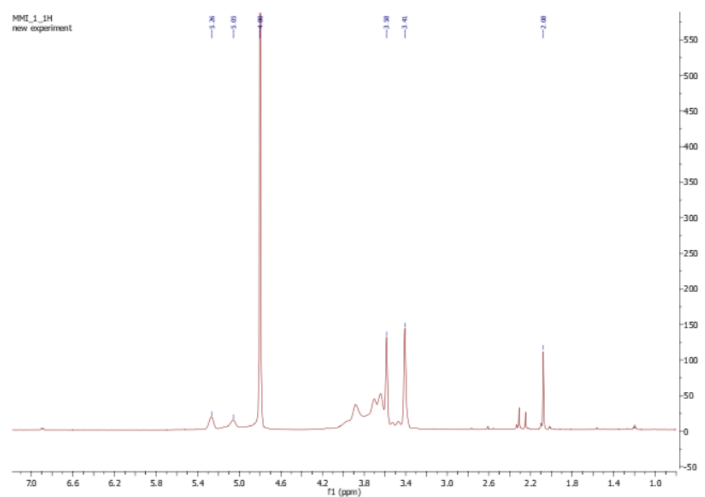
Εικόνα 73: ζ-δυναμικό συμπλόκου Quin-HP-β-CD (1:1, solvent evaporation & freeze drying)



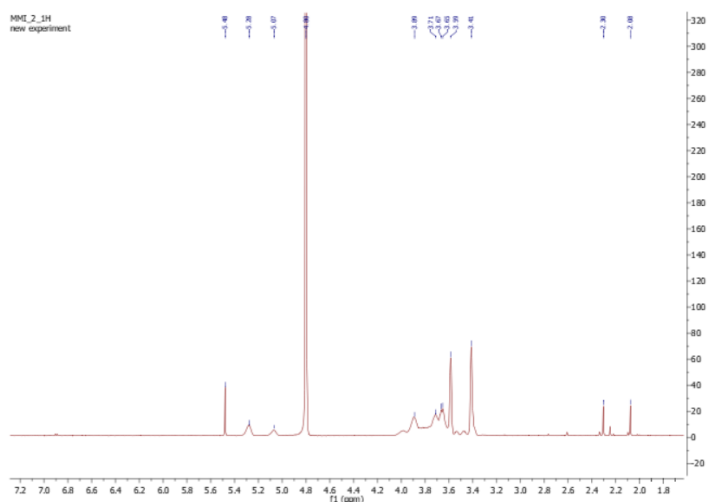
Εικόνα 74: Φάσμα 1H NMR του συμπλόκου Quin-β-CD (2:1, kneading)



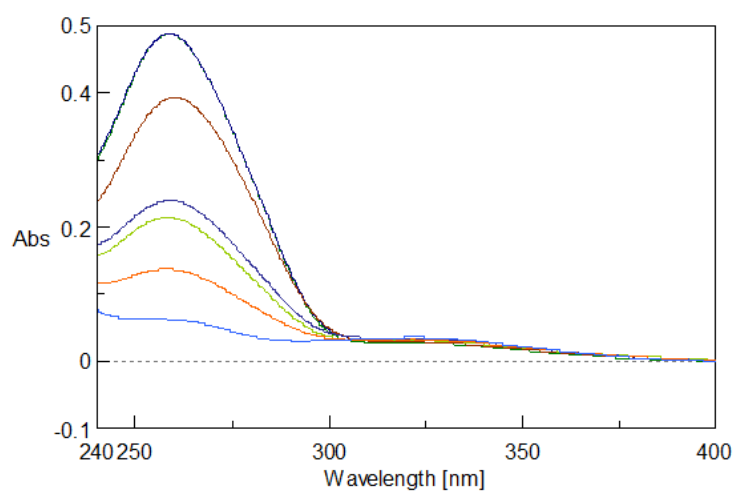
Εικόνα 75: Φάσμα 1H NMR του συμπλόκου Quin-β-CD (1:1, solvent evaporation & freeze drying)



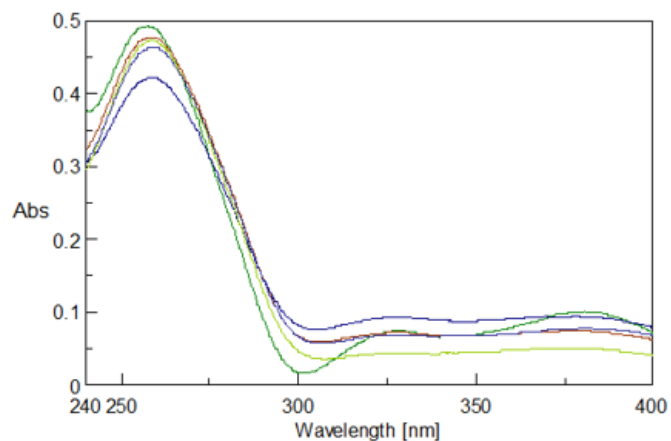
Εικόνα 76: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου *Quin-Me-β-CD* (2:1, kneading)



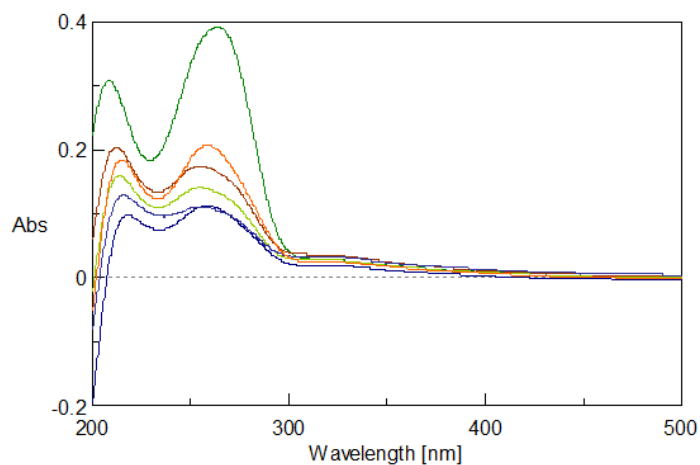
Εικόνα 77: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου *Quin-Me-β-CD* (1:1, kneading)



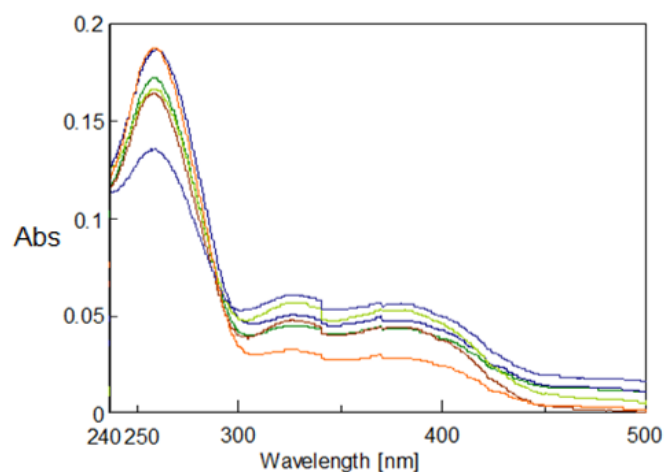
Εικόνα 78: Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου *Quin-β-CD* (2:1, kneading) με συγκέντρωση απελευθερώμενης κιναιζολινόνης  $10\mu\text{M}$  σε διαφορετικές συγκεντρώσεις *ct-DNA*, σταθερά  $K_b=1.10\cdot 10^4\text{ M}^{-1}$



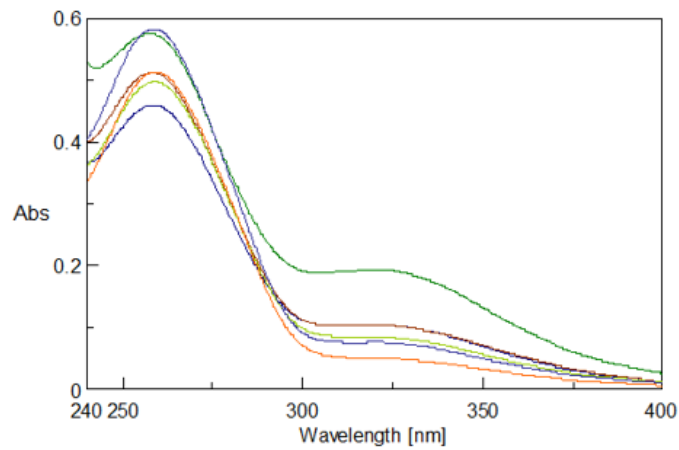
Εικόνα 79: Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Quin-Me-β-CD (2:1, kneading) με συγκέντρωση απελευθερώμενης κιναζολινόνης 10μM σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA, σταθερά  $K_b=0.77 \cdot 10^4 M^{-1}$



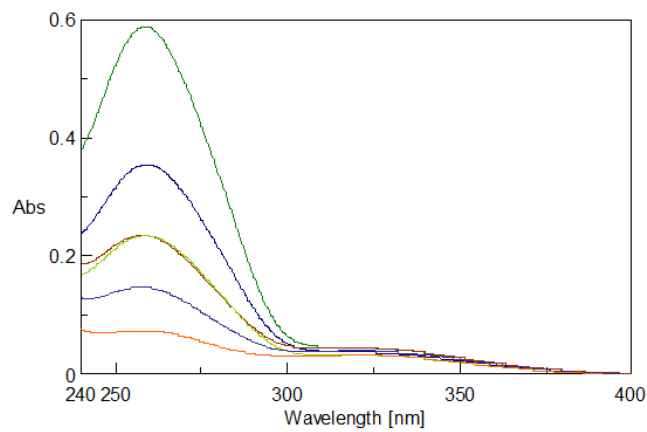
Εικόνα 80: Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Quin-Me-β-CD (1:1, kneading) με συγκέντρωση απελευθερώμενης κιναζολινόνης 10μM σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA, σταθερά  $K_b=1.66 \cdot 10^4 M^{-1}$



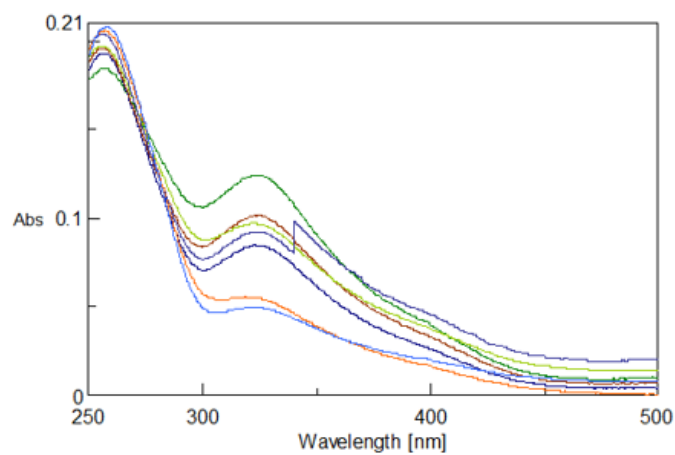
Εικόνα 81: Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Quin-HP-β-CD (2:1, kneading) με συγκέντρωση απελευθερώμενης κιναζολινόνης 10μM σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA, σταθερά  $K_b=2.19 \cdot 10^4 M^{-1}$



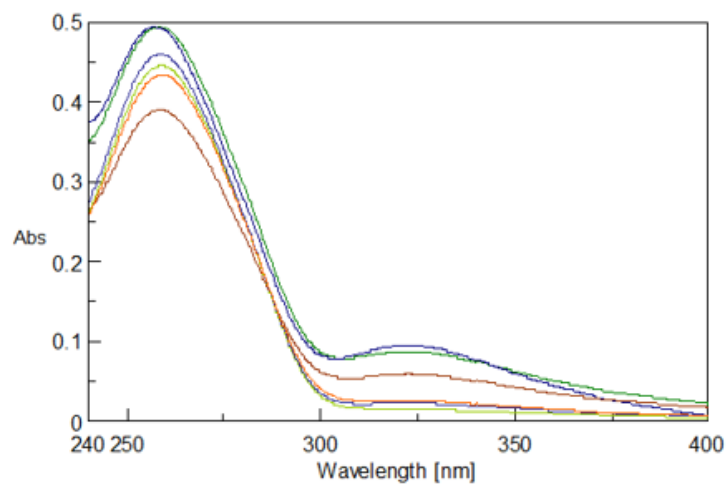
Εικόνα 82: Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Quin-β-CD (2:1, solvent evaporation & freeze drying) με συγκέντρωση απελευθερωμένης κιναιζολινόνης 10μM σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA, σταθερά  $K_b=1.29 \cdot 10^4 M^{-1}$



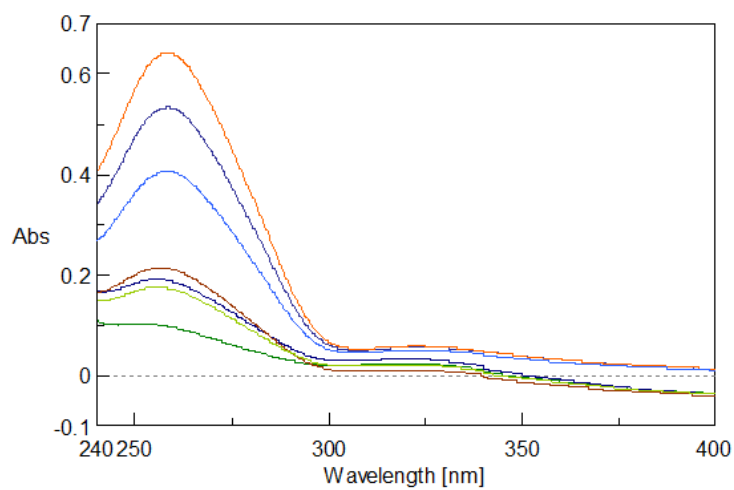
Εικόνα 83: Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Quin-β-CD (1:1, solvent evaporation & freeze drying) με συγκέντρωση απελευθερωμένης κιναιζολινόνης 10μM σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA, σταθερά  $K_b=1.06 \cdot 10^4 M^{-1}$



Εικόνα 84: Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Quin-Me-β-CD (2:1, solvent evaporation & freeze drying) με συγκέντρωση απελευθερωμένης κιναιζολινόνης 10μM σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA, σταθερά  $K_b=2.26 \cdot 10^4 M^{-1}$



Εικόνα 85: Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Quin-Me-β-CD (1:1, solvent evaporation & freeze drying) με συγκέντρωση απελευθερώμενης κιναζολινόνης 10μM σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA, σταθερά  $K_b=1.35 \cdot 10^4 M^{-1}$



Εικόνα 86: Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Quin-HP-β-CD (1:1, solvent evaporation & freeze drying) με συγκέντρωση απελευθερώμενης κιναζολινόνης 10μM σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA, σταθερά  $K_b=2.02 \cdot 10^4 M^{-1}$

## Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1: Παραδείγματα φαρμακευτικών κιναζολινονών και η θεραπευτική τους ιδιότητα <sup>4,6</sup> .....	11
Πίνακας 2: Βασικά χαρακτηριστικά $\alpha$ -CD, $\beta$ -CD, $\gamma$ -CD <sup>10</sup> .....	14
Πίνακας 3: Αναλογίες κιναζολινόνης/ κυκλοδεξτρίνης για τα σύμπλοκα εγκλεισμού που παρασκευάστηκαν .....	40
Πίνακας 4: Ποσότητες κιναζολινόνης και $\beta$ -κυκλοδεξτρινών για την παραγωγή συμπλόκων εγκλεισμού με την μέθοδο kneading .....	40
Πίνακας 5: Συγκεντρώσεις κιναζολινόνης και κιναζολινόνης+ $\beta$ -CD και οι αντίστοιχες απορροφήσεις των δειγμάτων.....	41
Πίνακας 6: Ποσότητες κιναζολινόνης και $\beta$ -κυκλοδεξτρινών για την παραγωγή συμπλόκων εγκλεισμού με την μέθοδο solvent evaporation & freeze drying.....	42
Πίνακας 7: Αποδόσεις διεργασίας συμπλόκων εγκλεισμού που συντέθηκαν με την μέθοδο kneading .....	47
Πίνακας 8: Αποδόσεις διεργασίας συμπλόκων εγκλεισμού που συντέθηκαν με την μέθοδο solvent evaporation & freeze drying.....	47
Πίνακας 9: Αποδόσεις εγκλεισμού των συμπλόκων που συντέθηκαν με την μέθοδο kneading .....	48
Πίνακας 10: Αποδόσεις εγκλεισμού των συμπλόκων που συντέθηκαν με την μέθοδο solvent evaporation & freeze drying.....	49
Πίνακας 11: Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό για τα σύμπλοκα εγκλεισμού που παρασκευάστηκαν με την μέθοδο kneading.....	49
Πίνακας 12: Μέγεθος, δείκτης πολυδιασποράς και ζ-δυναμικό για τα σύμπλοκα εγκλεισμού που παρασκευάστηκαν με την μέθοδο solvent evaporation & freeze drying.....	50
Πίνακας 13: Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της $\beta$ -CD και του συμπλόκου Quin- $\beta$ -CD (2:1, solvent evaporation & freeze drying) .....	53
Πίνακας 14: Burst effect και plateau για κάθε σύμπλοκο εγκλεισμού.....	57
Πίνακας 15: Συντελεστής $R^2$ κινητικών μοντέλων για κάθε σύμπλοκο .....	58
Πίνακας 16: Εξισώσεις του μοντέλου Korsmeyer – Peppas και μηχανισμοί απελευθέρωσης για κάθε σύμπλοκο εγκλεισμού .....	59
Πίνακας 17: Σταθερές αλληλεπίδρασης $K_b$ .....	61
Πίνακας 18: Ενέργεια αλληλεπίδρασης κιναζολινόνης- DNA, αριθμός δεσμών υδρογόνου και τα νουκλεοτίδια που συμμετέχουν σε αυτούς .....	64



## Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1: Δομή της 2-κυανοκιναζολινόνης <sup>4</sup> .....	8
Εικόνα 2: Βασική δομή κιναζολινόνης <sup>3</sup> .....	8
Εικόνα 3: Βασική δομή 2-(1H)-κιναζολινόνης και 4-(3H)-κιναζολινόνης <sup>6</sup> .....	9
Εικόνα 4: 2-υποκατεστημένη-4-(3H)-κιναζολινόνη <sup>5</sup> .....	9
Εικόνα 5: 3-υποκατεστημένη-4-(3H)-κιναζολινόνη <sup>5</sup> .....	9
Εικόνα 6: 2,3-διυποκατεστημένη-4-(3H)-κιναζολινόνη <sup>5</sup> .....	9
Εικόνα 7: Σύνθεση Niementowski. a) 130-150°C, 6h b) μικροκυματική ακτινοβολία 60W, 20min <sup>7</sup> .....	10
Εικόνα 8: Συμπύκνωση ουρεθάνης με ακετανιλίδη <sup>6</sup> .....	10
Εικόνα 9: Αντίδραση συμπύκνωσης ακυλανθρανιλικού οξέος με πρωτοταγής αμίνη <sup>6</sup> .....	11
Εικόνα 10: Δομή κυκλοδεξτρίνης <sup>8</sup> .....	14
Εικόνα 11: Οι πιο κοινές κυκλοδεξτρίνες: α-CD, β-CD, γ-CD <sup>10</sup> .....	14
Εικόνα 12: Δομή β-κυκλοδεξτρίνης (R=H), μεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνης (R=CH <sub>3</sub> ) και 2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης (R=CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>3</sub> ) <sup>8</sup> .....	15
Εικόνα 13: Πιθανές αναλογίες φιλοξενούμενου μορίου/κυκλοδεξτρίνης προς σχηματισμό συμπλόκων <sup>38</sup> .....	18
Εικόνα 14: Τρόπος λειτουργίας του DLS <sup>17</sup> .....	20
Εικόνα 15: Αρνητικά φορτισμένο άτομο και οι στιβάδες που δημιουργούνται γύρω από αυτό <sup>19</sup> .....	21
Εικόνα 16: Μηχανισμοί απελευθέρωσης φαρμακευτικής ουσίας από πολυμερικά συστήματα: Α) Διάχυση μέσω πληρωμένων πόρων με νερό, Β) Διάχυση μέσω πολυμερικής μήτρας, C) Ωσμωτική άντληση, D) Διάβρωση πολυμερικής μήτρας. <sup>25</sup> .....	22
Εικόνα 17: Προφίλ απελευθέρωσης <sup>25</sup> .....	23
Εικόνα 18: Burst release effect <sup>25</sup> .....	24
Εικόνα 19: Παράδειγμα διαγράμματος ενός μοντέλου απελευθέρωσης μηδενικής τάξης <sup>27</sup> <sup>25</sup> .....	25
Εικόνα 20: Παράδειγμα διαγράμματος ενός μοντέλου απελευθέρωσης πρώτης τάξης <sup>27</sup> ...	26
Εικόνα 21: Παράδειγμα διαγράμματος ενός μοντέλου απελευθέρωσης Higuchi <sup>27</sup> .....	26
Εικόνα 22: Παράδειγμα διαγράμματος ενός μοντέλου απελευθέρωσης Korsmeyer – Peppas <sup>27</sup> .....	27
Εικόνα 23: Δέσμευση ιόντος στο DNA μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων <sup>31</sup> .....	28
Εικόνα 24: 3D απεικόνιση παρεμβολής μορίου στο DNA <sup>30</sup> .....	29
Εικόνα 25: Αριστερά: Απεικόνιση δέσμευσης μορίου στην μικρή αύλακα του DNA. Δεξιά: Απεικόνιση δέσμευσης μορίου στην μεγάλη αύλακα του DNA <sup>30</sup> .....	29
Εικόνα 26: Πρωτονιωμένη μορφή του ellipticine <sup>32</sup> .....	30
Εικόνα 27: TAS-103 <sup>32</sup> .....	30
Εικόνα 28: Mitonafide: R=NO <sub>2</sub> , Amonafide: R=NH <sub>2</sub> <sup>32</sup> .....	31
Εικόνα 29: Tallimustine <sup>33</sup> .....	31
Εικόνα 30: PNU-145156E <sup>33</sup> .....	32
Εικόνα 31: Adozelesin <sup>33</sup> .....	32
Εικόνα 32: Bizelesin <sup>33</sup> .....	32
Εικόνα 33: Altromycin B και Hedamycin με τους εποξειδικούς δακτυλίους τους <sup>34</sup> .....	33
Εικόνα 34: Οι έλικες του DNA με κυκλωμένα τα άζωτα στην θέση 7 της πουρίνης <sup>34</sup> .....	33
Εικόνα 35: Neocarzinostatin <sup>34</sup> .....	34
Εικόνα 36: Hematoxylin <sup>35</sup> .....	34

Εικόνα 37: TBAB <sup>36</sup> .....	35
Εικόνα 38: Σύμπλοκο εγκλεισμού ναρινγκίνης/β-CD με αναλογία 1:2 <sup>37</sup> .....	35
Εικόνα 39: Σύμπλοκο εγκλεισμού ναρινγκενίνης/β-CD με αναλογία 1:2 <sup>37</sup> .....	36
Εικόνα 40: Μεθοδολογία σύνθεσης 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτροκιναζολιν-4(3H)-όνη.....	39
Εικόνα 41: Φάσμα πρωτονίου <sup>1</sup> H NMR της 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτρο-κιναζολιν-4(3H)-όνης (600 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ).....	51
Εικόνα 42: Φάσματα πρωτονίου <sup>1</sup> H NMR της β-CD και Quin-β-CD (600 MHz, D <sub>2</sub> O).....	52
Εικόνα 43: Στερεοχημική δομή της β-κυκλοδεξτρίνης (αριστερά) και απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής του κοίλου κώνου με τα εσωτερικά και εξωτερικά πρωτόνια (δεξιά). <sup>38</sup> .....	53
Εικόνα 44: Φάσμα FT-IR της ένωσης 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτροκιναζολιν-4(3H)-όνη.....	54
Εικόνα 45: Φάσμα FT-IR της β-CD .....	54
Εικόνα 46: Φάσμα FT-IR του συμπλόκου εγκλεισμού Quin-β-CD (2:1, solvent evaporation & freeze drying).....	55
Εικόνα 47: Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων καθαρής κιναζολινόνης συγκέντρωσης 10 μM σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA (0-100 μM) .....	60
Εικόνα 48: Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Quin-HP-β-CD (1:1, kneading) με συγκέντρωση απελευθερωμένης κιναζολινόνης 10 μM σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA, σταθερά $K_b=5.86 \cdot 10^4 M^{-1}$ .....	62
Εικόνα 49: Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Quin-HP-β-CD (2:1, solvent evaporation & freeze drying) με συγκέντρωση απελευθερωμένης κιναζολινόνης 10 μM σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA, σταθερά $K_b=2.50 \cdot 10^4 M^{-1}$ .....	63
Εικόνα 50: Απεικόνιση μέσω PyMol της δέσμευσης της κιναζολινόνης στην μικρή αύλακα του DNA. Με κίτρινες διακεκομμένες γραμμές απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου με τα νουκλεοτίδια. ....	64
Εικόνα 51: 3-αμινο-2-μεθυλο-6-νιτροκιναζολιν-4(3H)-όνη .....	64
Εικόνα 52: Κατανομή μεγέθους συμπλόκου Quin-β-CD (2:1, kneading).....	67
Εικόνα 53: Κατανομή μεγέθους συμπλόκου Quin-Me-β-CD (2:1, kneading) .....	67
Εικόνα 54: Κατανομή μεγέθους συμπλόκου Quin-Me-β-CD (1:1, kneading) .....	67
Εικόνα 55: Κατανομή μεγέθους συμπλόκου Quin-HP-β-CD (2:1, kneading).....	68
Εικόνα 56: Κατανομή μεγέθους συμπλόκου Quin-HP-β-CD (1:1, kneading).....	68
Εικόνα 57: Κατανομή μεγέθους συμπλόκου Quin-β-CD (2:1, solvent evaporation & freeze drying).....	68
Εικόνα 58: Κατανομή μεγέθους συμπλόκου Quin-β-CD (1:1, solvent evaporation & freeze drying).....	69
Εικόνα 59: Κατανομή μεγέθους συμπλόκου Quin-Me-β-CD (2:1, solvent evaporation & freeze drying).....	69
Εικόνα 60: Κατανομή μεγέθους συμπλόκου Quin-Me-β-CD (1:1, solvent evaporation & freeze drying).....	69
Εικόνα 61: Κατανομή μεγέθους συμπλόκου Quin-HP-β-CD (2:1, solvent evaporation & freeze drying).....	70
Εικόνα 62: Κατανομή μεγέθους συμπλόκου Quin-HP-β-CD (1:1, solvent evaporation & freeze drying).....	70
Εικόνα 63: ζ-δυναμικό συμπλόκου Quin-β-CD (2:1, kneading) .....	70
Εικόνα 64: ζ-δυναμικό συμπλόκου Quin-Me-β-CD (2:1, kneading).....	71
Εικόνα 65: ζ-δυναμικό συμπλόκου Quin-Me-β-CD (1:1, kneading).....	71
Εικόνα 66: ζ-δυναμικό συμπλόκου Quin-HP-β-CD (2:1, kneading).....	71

Εικόνα 67: ζ-δυναμικό συμπλόκου Quin-HP-β-CD (1:1, kneading).....	72
Εικόνα 68: ζ-δυναμικό συμπλόκου Quin-β-CD (2:1, solvent evaporation & freeze drying) ...	72
Εικόνα 69: ζ-δυναμικό συμπλόκου Quin-β-CD (1:1, solvent evaporation & freeze drying) ...	72
Εικόνα 70: ζ-δυναμικό συμπλόκου Quin-Me-β-CD (2:1, solvent evaporation & freeze drying) .....	73
Εικόνα 71: ζ-δυναμικό συμπλόκου Quin-Me-β-CD (1:1, solvent evaporation & freeze drying) .....	73
Εικόνα 72: ζ-δυναμικό συμπλόκου Quin-HP-β-CD (2:1, solvent evaporation & freeze drying) .....	73
Εικόνα 73: ζ-δυναμικό συμπλόκου Quin-HP-β-CD (1:1, solvent evaporation & freeze drying) .....	74
Εικόνα 74: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR του συμπλόκου Quin-β-CD (2:1, kneading) .....	74
Εικόνα 75: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR του συμπλόκου Quin-β-CD (1:1, solvent evaporation & freeze drying).....	74
Εικόνα 76: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR του συμπλόκου Quin-Me-β-CD (2:1, kneading).....	75
Εικόνα 77: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR του συμπλόκου Quin-Me-β-CD (1:1, kneading).....	75
Εικόνα 78: Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Quin-β-CD (2:1, kneading) με συγκέντρωση απελευθερώμενης κιναζολινόνης 10μM σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct- DNA, σταθερά $K_b=1.10 \cdot 10^4 M^{-1}$ .....	75
Εικόνα 79: Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Quin-Me-β-CD (2:1, kneading) με συγκέντρωση απελευθερώμενης κιναζολινόνης 10μM σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct- DNA, σταθερά $K_b=0.77 \cdot 10^4 M^{-1}$ .....	76
Εικόνα 80: Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Quin-Me-β-CD (1:1, kneading) με συγκέντρωση απελευθερώμενης κιναζολινόνης 10μM σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct- DNA, σταθερά $K_b=1.66 \cdot 10^4 M^{-1}$ .....	76
Εικόνα 81: Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Quin-HP-β-CD (2:1, kneading) με συγκέντρωση απελευθερώμενης κιναζολινόνης 10μM σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct- DNA, σταθερά $K_b=2.19 \cdot 10^4 M^{-1}$ .....	76
Εικόνα 82: Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Quin-β-CD (2:1, solvent evaporation & freeze drying) με συγκέντρωση απελευθερώμενης κιναζολινόνης 10μM σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA, σταθερά $K_b=1.29 \cdot 10^4 M^{-1}$ .....	77
Εικόνα 83: Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Quin-β-CD (1:1, solvent evaporation & freeze drying) με συγκέντρωση απελευθερώμενης κιναζολινόνης 10μM σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA, σταθερά $K_b=1.06 \cdot 10^4 M^{-1}$ .....	77
Εικόνα 84: Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Quin-Me-β-CD (2:1, solvent evaporation & freeze drying) με συγκέντρωση απελευθερώμενης κιναζολινόνης 10μM σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA, σταθερά $K_b=2.26 \cdot 10^4 M^{-1}$ .....	77
Εικόνα 85: Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Quin-Me-β-CD (1:1, solvent evaporation & freeze drying) με συγκέντρωση απελευθερώμενης κιναζολινόνης 10μM σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA, σταθερά $K_b=1.35 \cdot 10^4 M^{-1}$ .....	78
Εικόνα 86: Φάσμα UV-Vis διαλυμάτων συμπλόκου Quin-HP-β-CD (1:1, solvent evaporation & freeze drying) με συγκέντρωση απελευθερώμενης κιναζολινόνης 10μM σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ct-DNA, σταθερά $K_b=2.02 \cdot 10^4 M^{-1}$ .....	78

## Ευρετήριο Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Διάγραμμα Job's Plot για Quin-β-CD. Όπου ΔA η διαφορά απορροφήσεων κιναζολινόνης και μίγματος κιναζολινόνης και β-CD και $R=[Quin]/([Quin]+[β-CD])$ .....	41
Διάγραμμα 2: Καμπύλη ένωσης κιναζολινόνης για $\lambda=321.8$ nm .....	48
Διάγραμμα 3: Καμπύλες απελευθέρωσης συμπλόκων εγκλεισμού που παρασκευάστηκαν με την μέθοδο kneading .....	56
Διάγραμμα 4: Καμπύλες απελευθέρωσης συμπλόκων εγκλεισμού που παρασκευάστηκαν με την μέθοδο solvent evaporation & freeze drying .....	56
Διάγραμμα 5: Συγκριτικό διάγραμμα σταθερών αλληλεπίδρασης $K_b$ .....	62

## Βιβλιογραφία

1. Μπαϊρακτάρη, Μ. (2017). Σύνθεση παραγώγων 3-αμινο-κιναζολινονών και μελέτη της πιθανότητας πρόκλησης φωτοδιάσπασης στο DNA. <http://dx.doi.org/10.26257/heal.duth.11263>
2. Khan, I., Zaib, S., Batool, S., Abbas, N., Ashraf, Z., Iqbal, J., & Saeed, A. (2016). Quinazolines and quinazolinones as ubiquitous structural fragments in medicinal chemistry: An update on the development of synthetic methods and pharmacological diversification. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(11), 2361–2381. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.03.031>
3. Armarego, W. L. F. (1963). Quinazolines. *Advances in Heterocyclic Chemistry*, 1(C), 253–309. [https://doi.org/10.1016/S0065-2725\(08\)60527-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2725(08)60527-9)
4. Mhaske, S. B., & Argade, N. P. (2006). The chemistry of recently isolated naturally occurring quinazolinone alkaloids. *Tetrahedron*, 62(42), 9787-9826. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.07.098>
5. Connolly, D. J., Cusack, D., O'Sullivan, T. P., & Guiry, P. J. (2005). Synthesis of quinazolinones and quinazolines. *Tetrahedron*, 43(61), 10153-10202. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.07.010>
6. Kumar Tiwary, B., Pradhan, K., Kumar Nanda, A., & Chakraborty, R. (2016). Implication of Quinazoline-4(3H)-ones in Medicinal Chemistry: A Brief Review. *Journal of Chemical Biology & Therapeutics*, 01(02). <https://doi.org/10.4172/2572-0406.1000104>
7. He, L., Li, H., Chen, J., & Wu, X. F. (2014). Recent advances in 4 (3 H)-quinazolinone syntheses. *RSC advances*, 4(24), 12065-12077. <https://doi.org/10.1039/c4ra00351a>
8. Leclercq, L. (2016). Interactions between cyclodextrins and cellular components: Towards greener medical applications?. *Beilstein journal of organic chemistry*, 12(1), 2644-2662. <https://doi.org/10.3762/bjoc.12.261>
9. Del Valle, E. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process biochemistry*, 39(9), 1033-1046. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00258-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00258-9)
10. Khan, N. A., & Durakshan, M. (2013). Cyclodextrin: an overview. *Int J Bioassays*, 2, 858-65.
11. Budhwar, V. (2018). Cyclodextrin complexes: An approach to improve the physicochemical properties of drugs and applications of cyclodextrin complexes. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian J Pharm*, 12(02). <http://dx.doi.org/10.22377/ajp.v12i02.2367>
12. Nireesha, G. R., Divya, L., Sowmya, C., Venkateshan, N. N. B. M., & Lavakumar, V. (2013). Lyophilization/freeze drying-an review. *International journal of novel trends in pharmaceutical sciences*, 3(4), 87-98.

13. Kotronia, M., Kavetsou, E., Loupassaki, S., Kikionis, S., Vouyiouka, S., & Detsi, A. (2017). Encapsulation of Oregano (*Origanum onites* L.) essential oil in  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD): Synthesis and characterization of the inclusion complexes. *Bioengineering*, 4(3), 74. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4030074>
14. Qi, Q., & Zimmermann, W. (2005). Cyclodextrin glucanotransferase: from gene to applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(5), 475-485. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1781-5>
15. Biver, A., Antranikian, G., & Heinzle, E. (2002). Enzymatic production of cyclodextrins. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(6), 609-617. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1057-x>
16. Pecora, R. (2000). Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *Journal of nanoparticle research*, 2(2), 123-131. <https://doi.org/10.1023/A:1010067107182>
17. Babick, F. (2020). Dynamic light scattering (DLS). In *Characterization of Nanoparticles* (pp. 137-172). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00010-9>
18. Dukhin, A. S., & Xu, R. (2020). Zeta-potential measurements. In *Characterization of Nanoparticles* (pp. 213-224). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00014-6>
19. Park, S. J., & Seo, M. K. (2011). Intermolecular force. *Interface Science and Technology*, 18, 1-57. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375049-5.00001-3>
20. Xu, R. (2008). Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. *Particuology*, 6(2), 112-115. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2007.12.002>
21. Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., ... & Mozafari, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
22. Diehl, B. (2008). Principles in NMR spectroscopy. In *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis* (pp. 1-41). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53173-5.00001-9>
23. Singhvi, G., & Singh, M. (2011). In-vitro drug release characterization models. *Int J Pharm Stud Res*, 2(1), 77-84.
24. Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., & Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm*, 67(3), 217-223.
25. Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., & Farokhzad, O. C. (2016). Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release. *Chemical reviews*, 116(4), 2602-2663. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00346>

26. Paarakh, M. P., Jose, P. A., Setty, C. M., & Christopher, G. P. (2018). Release kinetics—concepts and applications. *Int J Pharm Res Technol*, 8(1), 12-20.
27. Sreedharan, S. M., & Singh, R. (2019). Ciprofloxacin functionalized biogenic gold nanoflowers as nanoantibiotics against pathogenic bacterial strains. *International journal of nanomedicine*, 14, 9905. <https://doi.org/10.2147/IJN.S224488>
28. Rauf, S., Gooding, J. J., Akhtar, K., Ghauri, M. A., Rahman, M., Anwar, M. A., & Khalid, A. M. (2005). Electrochemical approach of anticancer drugs–DNA interaction. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 37(2), 205-217. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.10.037>
29. Palchaudhuri, R., & Hergenrother, P. J. (2007). DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current opinion in biotechnology*, 18(6), 497-503. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.09.006>
30. Gilad, Y., & Senderowitz, H. (2014). Docking studies on DNA intercalators. *Journal of chemical information and modeling*, 54(1), 96-107. <https://doi.org/10.1021/ci400352t>
31. Sirajuddin, M., Ali, S., & Badshah, A. (2013). Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 124, 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.03.013>
32. Goftar, M. K., Kor, N. M., & Kor, Z. M. (2014). DNA intercalators and using them as anticancer drugs. *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res*, 2(3), 811-822.
33. Cai, X., Gray Jr, P. J., & Von Hoff, D. D. (2009). DNA minor groove binders: back in the groove. *Cancer treatment reviews*, 35(5), 437-450. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2009.02.004>
34. Hamilton, P. L., & Arya, D. P. (2012). Natural product DNA major groove binders. *Natural product reports*, 29(2), 134-143. <https://doi.org/10.1039/c1np00054c>
35. Xu, D., Wang, X., Fei, D., & Ding, L. (2010). Study on the Interaction Between the Inclusion Complex of Hematoxylin with  $\beta$ -Cyclodextrin and DNA. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 29(11-12), 854-866. <https://doi.org/10.1080/15257770.2010.531858>
36. Chakraborty, S., Ghosh, P., Basu, B., & Mandal, A. (2019). Inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin with tetrabutylammonium bromide: Synthesis, characterization and interaction with calf thymus DNA. *Journal of Molecular Liquids*, 293, 111525. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111525>
37. Yousuf, S., & Enoch, I. V. M. V. (2013). Binding interactions of naringenin and naringin with calf thymus DNA and the role of  $\beta$ -cyclodextrin in the binding. *AAPS PharmSciTech*, 14(2), 770-781. <https://doi.org/10.1208/s12249-013-9963-z>

38. Roy, M. N., Saha, S., Kundu, M., Saha, B. C., & Barman, S. (2016). Exploration of inclusion complexes of neurotransmitters with  $\beta$ -cyclodextrin by physicochemical techniques. *Chemical Physics Letters*, 655, 43-50.  
<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2016.05.031>