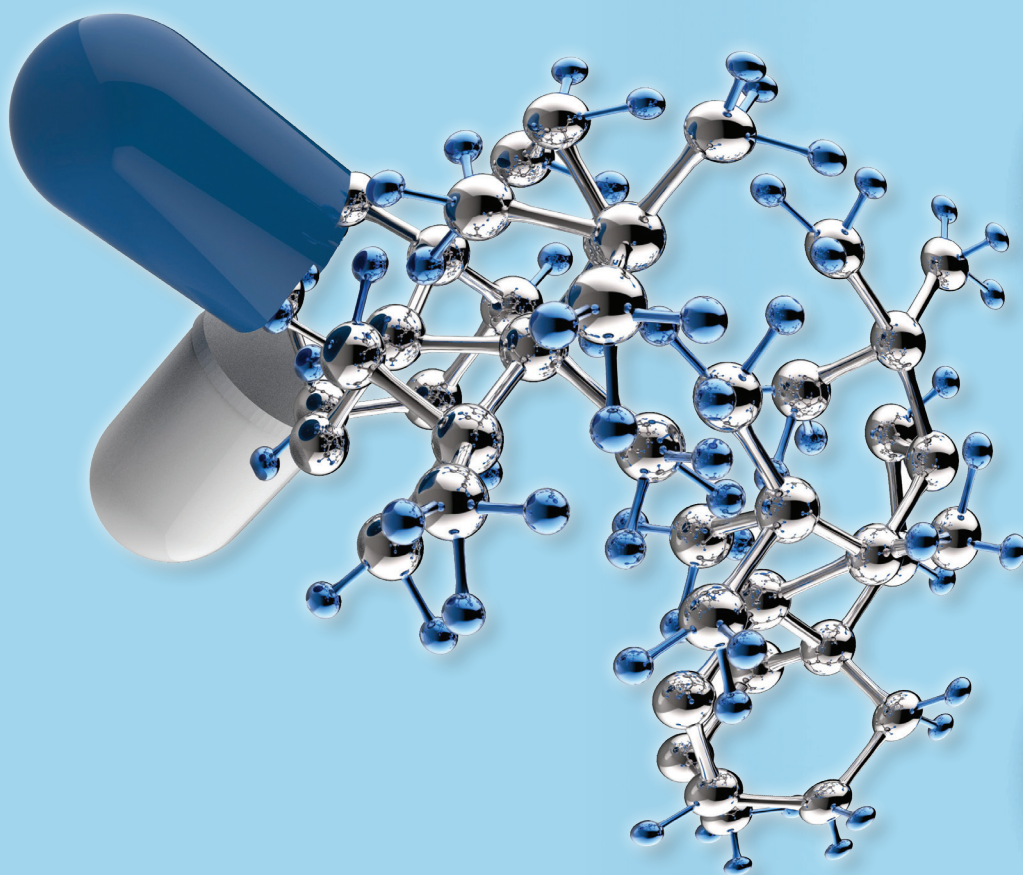


ISSN 1105-4999



ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ PHARMAKEFTIKI

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΜΕ ΘΕΜΑΤΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
A QUARTERLY EDITION ON PHARMACEUTICAL SCIENCES' TOPICS



ΤΟΜΟΣ 34 • ΤΕΥΧΟΣ III
VOLUME ISSUE

ΙΟΥΛΙΟΣ - ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2022
JULY - SEPTEMBER

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΜΕ ΘΕΜΑΤΑ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΟΣ 34, ΤΕΥΧΟΣ II,
ΙΟΥΛΙΟΣ - ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2022

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΣΥΝΤΑΞΗΣ

A. Τσαντίλη

Ομοτ. Καθηγήτρια, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ)
tsantili@pharm.uoa.gr

ΑΡΧΙΣΥΝΤΑΚΤΗΣ

Γ.Α. Καρίκας

Ομότιμος καθηγητής, Πανεπιστήμιο
Δυτικής Αττικής, karikasg@uniwa.gr

ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κ. Δεμέτζος

Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Β. Δημόπουλος

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, ΑΠΘ

Ν. Κόλμαν

Galenica SA

Χ. Κοντογιώργης,

Επ. Καθηγητής, Δ.Π.Θ.

Π. Κουρουνάκης

Ομοτ. Καθηγητής,

Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, ΑΠΘ

Π. Μαχαίρας

Ομοτ. Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Σ. Νικολαρόπουλος

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Γ. Πάιρας

Αναπλ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Ε. Παντερή

Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ

Δ. Ρέκκας

Αναπλ. Καθηγητής, ΕΚΠΑ

PHARMAKEFTIKI

A QUARTERLY EDITION
ON PHARMACEUTICAL SCIENCES' TOPICS
VOLUME 34, ISSUE II,
JULY - SEPTEMBER 2022

EDITOR

A. Tsantili

Emeritus Professor, National and Kapodistrian
University of Athens (NKUA)
tsantili@pharm.uoa.gr

CO EDITOR

G.A. Karikas

Emeritus professor, University of West Attica,
Greece, karikasg@uniwa.gr

EDITORIAL BOARD

C. Demetzos

Professor, NKUA

V.J. Demopoulos

Professor, University of Thessaloniki, AUTH

N. Kolman

Galenica SA

Ch. Kontogiorgis

Assistant Professor, D.U.Th.

P. Kourounakis

Emeritus Professor,

University of Thessaloniki, AUTH

P. Macheras

Emeritus Professor, NKUA

S. Nikolaropoulos

Professor, University of Patras

G. Pairas

Associate Professor, University of Patras

I. Panderi

Professor, NKUA

D. Rekkas

Associate Professor, NKUA

Οδηγίες προς συγγραφείς/Authors guidelines: <https://www.hsmc.gr/author-guidelines/>

E-mail για υποβολή εργασιών:

tsantili@pharm.uoa.gr, karikasg@uniwa.gr

Για την ηλεκτρονική έκδοση της «Φαρμακευτικής»
και οδηγίες προς συγγραφείς
επισκεφτείτε την διεύθυνση: www.hsmc.gr

E-mail for manuscript submission:

tsantili@pharm.uoa.gr, karikasg@uniwa.gr

For "Pharmakeftiki" electronic edition
and instructions to authors
please visit www.hsmc.gr

Τα άρθρα που δημοσιεύονται
στην «Φαρμακευτική» καταχωρούνται
στα Chemical Abstracts, EMBASE,
SCOPUS και EBSCO

Articles published in "Pharmakeftiki"
are indexed in Chemical Abstracts,
EMBASE, SCOPUS and EBSCO



ZITA CONGRESS & EVENT
M A N A G E M E N T

εμείς τον ενθουσιασμό και την εμπειρία . . .

. . . εσείς την σιγουριά της επιτυχίας
του οργανωτικού και οικονομικού αποτελέσματος



συμβάλλουμε με διαφάνεια και εμπειρία **40** χρόνων
στους άμεσους στόχους και τα οράματά σας

www.zita-group.com

Ομήρου 29, Πέτα Σαρωνικού, 190 01, Αττική, Ελλάδα, Τηλ: +30 22994 40964
info@zitacongressevents.com

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ / CONTENTS

Pharmaceutical Care and its importance through pharmacoepidemiological studies

Vasiliki Alexandra Gavriloglou, Christos Kontogiorgis and Theodoros C. Constantinidis 97-102

Σακχαρώδης Διαβήτης στη Νόσο Alzheimer. Αλληλεπίδραση σε μηχανιστικό και θεραπευτικό επίπεδο

Θεοδόσης-Νόμπελος Παναγιώτης, Κόκκινος Σταύρος, Τριάντης Χαράλαμπος..... 103-117

Application of Factorial Design to evaluate the effect of Antioxidants on the stability of N-Acetylcysteine and Acebrophylline Immediate Release Bilayer Tablets

Kumaravelrajan R. Gokul Raj M, Ch. Ajay Babu, Suba V, Grace Rathnam 118-131

Synthesis and biological evaluation of some quinazoline derivatives

Fatimah Alhudaby, Duha Al-Dhalemi, Qais Abualassal, Zead Abudayeh, Eyad Mallah and Luay Abu-Qatouseh 132-142

Εκδηλώσεις 143

Pharmaceutical Care and its importance through pharmacoepidemiological studies

Vasiliki Alexandra Gavriloglou, Christos Kontogiorgis and Theodoros C. Constantinidis 97-102

Diabetes in Alzheimer disease Interaction at mechanistic and therapeutic level

Theodosios-Nobelos Panagiotis, Kokkinos Stavros, Triantis Charalampos 103-117

Application of Factorial Design to evaluate the effect of Antioxidants on the stability of N-Acetylcysteine and Acebrophylline Immediate Release Bilayer Tablets

Kumaravelrajan R. Gokul Raj M, Ch. Ajay Babu, Suba V, Grace Rathnam 118-131

Synthesis and biological evaluation of some quinazoline derivatives

Fatimah Alhudaby, Duha Al-Dhalemi, Qais Abualassal, Zead Abudayeh, Eyad Mallah and Luay Abu-Qatouseh 132-142

Meetings 143

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ
ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΧΗΜΕΙΑΣ
& ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

PHARMAKEFTIKI

A QUARTERLY JOINT EDITION OF
THE HELLENIC SOCIETY OF
MEDICINAL CHEMISTRY &
THE HELLENIC PHARMACEUTICAL SOCIETY



ZITA MEDICAL MANAGEMENT, Ομήρου 29Α, Πέτα Σαρωνικού, Ελλάδα
Τηλ.: + 30 22994 40962, E-mail: g.kouloumpis@zitamanagement.com

Pharmaceutical Care and its Importance through Pharmacoepidemiological Studies

Vasiliki Alexandra Gavriloglou, Christos Kontogiorgis* and Theodoros C. Constantinidis

Laboratory of Hygiene and Environmental Protection, Department of Medicine, Democritus University of Thrace, Alexandroupolis, Greece

KEYWORDS:

Pharmaceutical Care, Pharmacoepidemiological studies, Drug Therapy Problems, primary care, pharmaceutical care practitioner

ARTICLE INFO:

Received: June 24, 2022

Accepted: July 21, 2022,

Published on line: October 18, 2022

ABSTRACT

Objective: The main goal of our review is to determine the importance of Pharmaceutical Care through pharmacoepidemiological studies.

Methods: This is an observational, descriptive, retrospective and length-wise review.

Results: Pharmacoepidemiological studies specify and quantify the Drug Therapy Problems (DTP). The solution of DTPs is the main responsibility of the Pharmaceutical Care practitioner. Besides the qualitative results, pharmacoepidemiological studies provide the economic benefit of the implementation of Pharmaceutical Care.

Conclusion: Pharmaceutical Care supported by and at the same time contributing to the development of pharmacoepidemiological studies, leads to an improvement in the provision of quality health services and significant savings in care costs but still more research projects should be conducted to support this result.

* CORRESPONDING Introduction

AUTHOR:

Dr Christos Kontogiorgis,
Email: ckontogi@med.duth.gr

Pharmaceutical Care (PhC) is an additional personalized health service that complements primary care, expanding the range of healthcare services provided by qualified professional pharmacists (Pharmaceutical Care practitioners) within the pharmacy area.¹ PhC practitioner focuses on the pharmacotherapy of the patient using evidence-based scientific knowledge.^{2,3} More precisely, the purpose of the PhC's service is to identify, resolve and predict Drug Therapy Problems (DTPs).⁴ The DTP is any adverse event experienced by the patient that is possible to be related to his pharmacotherapy and prevents the achievement of the desired treatment goals.¹ DTPs represent the major responsibility of the PhC.^{5,6}

DTPs are categorized in a way to help the PhC practitioner identify and resolve them. The categories of DTPs are the following:^{1,6}

1) *Therapeutic Indication.* This category includes either the use of drugs by the

patient although there is no clinical indication, e.g. use of antibiotics for a viral infection, or the no usage of medication by the patient while there is a clinical indication, e.g. hypertensive patients not taking antihypertensive treatment.

2) *Therapeutic Effectiveness*. It refers to the qualitative ineffectiveness of a drug, e.g. a patient uses tablets although having swallowing difficulties, or quantitative ineffectiveness, e.g. a patient taking a lower dose of the drug than the recommended one.

3) *Therapeutic Safety*. The case where the drug is unsafe for qualitative reasons e.g. causes a headache, which is not dose-related, or for quantitative reasons, e.g. the dose of the drug is higher than the recommended ones.

4) *Therapeutic Adherence*. When the patient is not able to understand, remember or be able to take or he/she does not prefer the medicines that have been recommended for him/her.

The PhC process includes clear, measurable and achievable goals in a specific period.⁷

The main goal of the PhC is to improve the quality of patients' life by achieving specific results, such as treating the disease, stopping or delaying the pathological process, eliminating or reducing the symptoms of the patient and finally preventing a disease or its symptomatology.^{1,8}

Pharmacoepidemiological studies (PES), on the other hand, are the studies considering the use, and the effects, of drugs and other medical devices in the population. PES use the methods of epidemiology to study the content area of clinical pharmacology. Furthermore, PES explore the frequency of adverse drug reactions, so they can contribute to the scientific information about drug safety and effectiveness that is not available from premarketing studies,⁹ thus permitting a better assessment of the risk/benefit balance.¹⁰

The main goal of our review is to determine the importance of Pharmaceutical Care (PhC) through Pharmacoepidemiological studies (PES).

Methods

This is an observational, descriptive and retrospective review of the literature. The information

is collected from existing scientific papers or databases. An English-language search was performed on online databases such as PubMed, Scopus and google scholar. The following keywords were used: "pharmaceutical care", "pharmacoepidemiological studies", "drug therapy problems", "drug-related problems", "adverse drug reactions", "pharmaceutical care service", "pharmaceutical care practice", "pharmaceutical care practitioner".

Results

The recent bibliography focused on PhC through PES were analyzed. We have categorized the results into two different groups:

A. Pharmacoepidemiological studies with a high impact mainly on Drug Therapy Problems.

The PhC service can be described as the practical implementation of well-justified clinical pharmacology in primary care, to ensure the efficacy and safety of the pharmacotherapy for the patient.^{4,11} The identification, resolution and prediction of DTPs are included among the goals of the PhC service. Besides the enormous impact of DTPs on the quality of the life of the patients, they are also strongly associated with an increased cost of treatment, morbidity and mortality of patients.^{4,11}

PES that present and measure DTPs can show the potential quality results of improving the PhC service – such as resolving and predicting contraindications, duplications, prescription errors, interactions, inappropriate medication, etc.¹¹

The DTPs are counted among the most important causes of illness and mortality and are also implicated in 3-9% of hospital admissions. However, nearly more than 50% of DTPs have been judged as preventable and show us the potential improvement the PhC service can offer to the patient.¹²

Additionally, studies in Europe show that 17% of patients use inappropriate medication with the most frequent group being the NSAIDs (7%) and the long-acting benzodiazepines (5%).^{13,14,15,16} In this field the role of the PhC practitioner is to identify, resolve and predict those DTPs regarding indication, efficacy, safety and adherence.

In a large proportion of patients (almost 60%) at least one potential drug interaction has been identified and half of them were classified as “major”.^{17,18,19} Drug interactions, based on classification, are effectiveness DTP (e.g. fluoroquinolones combined with hypoglycemic affect blood glucose levels) or safety DTP (e.g. enoxaparin combined with NSAIDs lead to an increased risk of bleeding). The most common clinical consequences of drug interactions is increased risk of clinical side effects such as increased bleeding risk (22%), hypotension (15%), nephrotoxicity (13%) and electrolyte disturbances (10%).^{17,18,19}

From several studies, it has been found that 50% of chronic patients do not comply with their medication, which is referred as adherence DTP.²⁰ Non-adherence to the treatment affects both the quality and the expectancy of life's patient; for example, it is estimated that better adherence with antihypertensive therapy alone could prevent 86.000 premature deaths in the United States in one year and the average blood pressure (at age 40+) would have been 10-13% lower. The improvement of blood pressure was estimated to reduce the overall cost of hospital care in the United States.²¹

Furthermore, in the USA, annually 125.000 deaths occur due to not taking the drugs properly, and 69% of the reasons for hospitalization are caused by poor patient adherence to their drug regimen. Furthermore, 50% of patients on the new statins will discontinue medication after 6 months.²² Each one of those problems is categorized as adherence DTP.

The aforementioned studies prove that PhC can slow down the pathological process, prevents patient's symptoms but also increases the quality and expectancy of life through the identification, resolution and prediction of DTPs.

PES in the United States and the Netherlands have proven the improvement of the clinical outcome by the PhC. In particular, 61% of patients had one or more DTPs; identifying and solving them, resulted in the improvement or stabilization of the clinical condition in 83% of patients.²³ In USA,

PhC practice led to a reduction of the inappropriate prescribing of drugs, discontinuation of therapy along with increased patient adherence.⁶

Also, a cost-benefit analysis carried out in Spain, studied the medication of older patients (between 65 and 94 years) with polypharmacy between two groups: in the intervention group (IG) PhC practitioners were following up the patients' medication, in the control group (CG) the patients were taken the medication without external intervention. The study showed that the IG had a higher reduction rate in prescription drugs, increased quality of life and reduced medication cost.²⁴

B. Pharmacoepidemiological studies that show mainly the economic impact of Pharmaceutical Care.

In some countries, PhC practice has been applied by PhC practitioners for more than 25 years and the PES can show the economic impact on their National Health systems.

Among the results of PhC service are included reduced hospital admissions due to overdose, drug-induced adverse reactions and drug interactions. Furthermore, the PhC service led to the discontinuation of the use of over-the-counter medicines, more efficient use of medicines by the patient, improved patient adherence and proactive medicine practices. Each one of the above consequences leads to a reduction of the financial burden of pharmacotherapy in the health-care system.

An Australian study on the evaluation of PhC in the community pharmacy highlighted 526 Drug Therapy Problems in 179 patients. 432 of those DTPs were monitored and 75% of these problems had been well-managed by the end of the study. The economic analysis showed that the net annual cost savings per patient ranged from 40 to 311 Australian dollars.²⁵

Another study in the USA showed that a total of 218.113 patients (inpatients and outpatients) die every year due to adverse drug reactions (ADRs), which the PhC practitioner can identify,

resolve and predict. The PhC service has led to a 24-55% increase in adherence to the Care Plan, a 3.9-40% reduction in inappropriate prescriptions, and a 9-39.9% reduction in treatment interruption. Overall mortality has decreased by 7.9%. The above results translate into a reduction in the risk of drug-related mortality by 85% annually. Interestingly, the savings for hospitalizations, emergencies and home care were estimated to be 53.3 billion \$. The savings due to better compliance with the medication amounted to an additional 87.2 billion \$. Finally, the net cost of the PhC service was estimated at 19.2 billion \$.¹⁷

Another study that was performed on approximately 3.000 patients in the USA estimated the financial benefit of healthcare due to PhC, at 1.134.162 USA dollars (\$). The reduced cost was attributed to the avoidance of a visit to outpatient clinics (585.650\$) and the reduction of hospital admissions (354.002 \$). This represents a benefit-cost ratio of 2:1. In other words, it is proved that the provision of PhC by a PhC practitioner can save 2 \$ for every 1 \$ invested in the provision of the service.²³

A study in Sweden demonstrated that community pharmacy interventions in patients' DTPs are most likely to lead to favorable clinical and economic outcomes. In particular, in 358 cases (68%), the pharmacy interventions were judged to have produced an improved therapeutic effect in the patient, and in 172 cases (32%) to have prevented or relieved adverse drug reactions. Primary care visits were initiated for 151 patients (29%), and pharmacy interventions were assessed to save 68 (13%) primary care visits and 16 (3%) future hospitalizations. The potential societal cost savings extrapolated at the national level were estimated at € 358 million. This is 37 times the expected pharmacy personnel costs for identifying and correcting the DTPs.²⁶

Finally, a study in the USA concerning the cost-effectiveness of PhC in patients with type 2 diabetes in community pharmacies indicated that the increasing costs of PhC appeared to be offset by large cost savings (\$20.000 per patient) due to a reduc-

tion in diabetes-related morbidity and mortality (additional 0.44 per quality-adjusted life year).²⁷

Discussion

Our analysis of the above studies shows that the PhC through its positive impact on resolving DTPs improves the quality of patients' life and also has a substantial financial impact on the health care system.

The future of the implementation of the PhC service in each country depends on well-designed studies that will show its financial benefit. This is the most accepted way for PhC to attract the interest of the pharmaceutical and insurance companies and finally of the state authorities. Hopefully, this will lead to the legislation of PhC and even more to a general reorganization of the role of the PhC practitioner in the field of primary care of the National health system.

Conversely, the implementation of PhC in the community pharmacy, creating validated data through written documentation of the PhC can contribute to national PES that will identify whether patients:

- Practice preventive medicine (eg vaccination)
- Have the necessary information for their pharmacotherapy (eg route, method, frequency and duration of administration, etc)
- Comply with their medication (eg assessment of compliance scale)
- Use drugs without indication

Conclusions

The use of PESs at the service of the PhC is an essential aid to the PhC practitioner, as these studies determine which drugs are most commonly found in drug interactions, causes of adverse effects, inappropriate use and overdose effects. Also the PESs in the form of scientifically documented information organized into databases greatly facilitate the PhC practitioner during the implementation of PhC.

In conclusion, PhC supporting and contributing

to the development of PES, is leading to an improvement in the provision of quality healthcare services and a reduction in health care costs. Still, more research should be done to support the results in each national environment.

Pharmacists seem to be in the best position in the health care chain to detect, prevent and correct DTPs. They could have an important role in pro-

viding valid information on disease control. They could also be actively involved in patients' evaluation, information, and counseling. PhC should therefore become an integral part of the pharmacy profession and of good pharmacy practice.^{28,29} □

Conflicts of interest. No conflicts of interest have been declared by all the authors

References

1. Cipolle R., Strand L., Morley P. (2012). *Pharmaceutical Care Practice The patient centered approach to medication management*, 3rd ed. USA, The McGraw-Hill Companies.
2. Berenguer B., Martin-Calero M. Pharmaceutical care: past, present and future. *Curr. Pharm. Des.* 10(31),3931-46, 2004.
3. Otani M., Barros N. The Integrative Medicine and the construction of a new health model. *Ciencia & Saude Coletiva.* 16(3),1801-11, 2011.
4. Tefera G.M., Zeleke A.Z., Jima Y.M., Kedebe T.M. Drug Therapy Problems and the Role of Clinical Pharmacist in Surgery Ward: Prospective Observational and Interventional Study. *Drug Healthc. Patient Saf.* 12, 71-83, 2020
5. Hepler C., Strand L. Opportunities and responsibilities in pharmaceutical care. *Am. J. Hosp. Pharm.* 47(3),533-43, 1990.
6. Sanchez A. Teaching patient-centered care to pharmacy students. *Int. J. Clin. Pharm.* 33(1),55-7, 2011.
7. Martín-Calero M.J., Machuca M., Murillo M.D., Cansino J., Gastelurrutia M.A., Faus M.J. Structural process and implementation programs of pharmaceutical care in different countries. *Curr. Pharm. Des.* 10(31),3969-85, 2004.
8. Hepler C. Pharmaceutical care. *Pharm. World Sci.* 18(6),233-5, 1996.
9. Brian L. Strom, Kimmel S., Hennessy S. (2013) *Textbook of Pharmacoepidemiology*. 5th ed. USA, John Wiley & Sons Ltd.
10. Hilmer S., Gnjjidic D, Abernethy D. Pharmacoepidemiology in the postmarketing assessment of the safety and efficacy of drugs in older adults. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 67(2),181-8, 2012.
11. Hernaez B., Garralda M. Urionagüena de la Iglesia A., Isla Ruiz A., et. Supply of pharmaceutical care services: The key to a new model of health services. *Aten. Primaria.* 54(1),102198, 2022
12. Johnson J., Bootman J. Drug-related morbidity and mortality: a cost-of illness model. *Arch. Intern. Med.* 155(18), 1949-56, 1995.
13. Fialova D., Topinkova E., Gambassi G. Potentially Inappropriate Medication Use Among Elderly Home Care Patients in Europe. *JAMA* 293(11),1348-1358, 2005.
14. Onder G., Landi F., Cesari M., Gambassi G., Carbonin P., Bernabei R: Inappropriate medication use among hospitalized older adults in Italy: results from the Italian Group of Pharmacoepidemiology in the Elderly. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 59(2),157-162, 2003.
15. Van Der Hooft C., Jong G., Dieleman J., Verhamme K. et: Inappropriate drug prescribing in older adults: the updated 2002 Beers criteria – a population-based cohort study. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 60(2),137-4, 2005.
16. Brekke M., Rognstad S., Straand J et. Pharmacologically inappropriate prescriptions for elderly patients in general practice: How common?. Baseline data from The Prescription Peer Academic Detailing (Rx-PAD) study. *Scand. J. Prim. Health Care* 26(2),80-5, 2008 .
17. Etemad L., Hay J. Cost-Effectiveness Analysis of

- Pharmaceutical Care in a Medicare Drug Benefit Program. *Value in Health* 6(4), 425-35, 2003.
18. Mino-Leon D., Galvan-Plata M., Doubova S., Flores-Hernandez S., Reyes-Morales H. A pharmacoepidemiological study of potential drug interactions and their determinant factors in hospitalized patients. *Rev. Invest. Clin.* 63(2), 170-8, 2011.
 19. Rijkom J., Uijtendaa E., Ten Berg M., Van Solinge W., Egberts A. Frequency and nature of drug-drug interactions in a Dutch university hospital. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 68(2), 187-93, 2009.
 20. Osterberg L., Blaschke T. Adherence to medication. *N. Engl. J. Med.* 353:487-497, 2005.
 21. Cutler D.M., Long G., Berndt E.R. et al. The value of antihypertensive drugs: a perspective on medical innovation. *Health Aff (Millwood)*. 26:97-110, 2007.
 22. Institute NEHI. (2009) Thinking Outside the Pillbox: A System-wide Approach to Improving Patient Medication Adherence for Chronic Disease, Cambridge MA, New England Health Care Institute.
 23. Strand L., Cipolle R., Morley P., Frakes M. The Impact of Pharmaceutical Care Practice on the Practitioner and the Patient in the Ambulatory Practice Setting: Twenty-Five Years of Experience. *Curr. Pharm. Des.* 10, 3987-4001, 2004.
 24. Jódar-Sánchez F., Malet-Larrea A., et. Cost-Utility Analysis of a Medication Review with Follow-Up Service for Older Adults with Polypharmacy in Community Pharmacies in Spain: The conSIGUE Program. *Pharmacoeconomics* 33(6), 599-610, 2015.
 25. March G., Gilbert A., Routhead E., Quintrell N. Developing and evaluating a model for pharmaceutical care in Australian community pharmacies. *Int. J. Pharm. Pract.* 7(4), 220-29, 1999.
 26. Westerlund T., Marklund B. Assessment of the clinical and economic outcomes of pharmacy interventions in drug-related problems. *J. Clin. Pharm. Ther.* 34(3), 319-327, 2009.
 27. Hussein M., Brown L. PDB59 cost-effectiveness analysis of medication therapy management in patients with type 2 diabetes in community Pharmacy/Ambulatory care settings: Results from a decision-analytic markov model. *Value in Health* 15(4), A181, 2012.
 28. Foppe van Mil J. W., Schulz M. A Review of Pharmaceutical Care in Community Pharmacy in Europe. *Health Highlights.* 7(1), 155-168, 2006.
 29. Ghibu S., Juncan A., Rus L. et. The Particularities of Pharmaceutical Care in Improving Public Health Service during the COVID-19 Pandemic. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18(18), 9776, 2021.

Σακχαρώδης Διαβήτης στη Νόσο Alzheimer. Αλληλεπίδραση σε Μηχανιστικό και Θεραπευτικό επίπεδο

Θεοδόσης-Νόμπελος Παναγιώτης,* Κόκκινος Σταύρος, Τριάντης Χαράλαμπος
Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Frederick, Λευκωσία, Κύπρος

KEYWORDS:

Σακχαρώδης Διαβήτης;
Νόσος Alzheimer;
Αντιδιαβητικά Φάρμακα

ARTICLE INFO:

Received: May 15, 2022

Revised: July 26, 2022

Accepted: July 30, 2022

Published on line: October 18, 2022

* ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΓΡΑΦΙΑ:

Δρ Παναγιώτης
Θεοδόσης-Νόμπελος,
Email: hsc.np@frederick.ac.cy
Tel: +357 22394394
Γ. Φρειδερίκου 7, Λευκωσία,
1036, Κύπρος

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος Alzheimer (NA) και ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) είναι από τις πιο κοινές ασθένειες που σχετίζονται με τη γήρανση. Η παθολογία της NA σχετίζεται στενά με συσσωρευμένες αλλοιωμένες πρωτεΐνες που οδηγούν σε νευρωνική εκφύλιση και δυσλειτουργία στον εγκέφαλο. Ο διαβήτης χαρακτηρίζεται από αλλοιωμένη σηματοδότηση ινσουλίνης που οδηγεί σε μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης, μεταβολική καταστολή των κυττάρων που καταναλώνουν ενέργεια, και μετατρέπουν την γλυκόζη σε λίπος, στο ήπαρ. Παρά τα διακριτά τους χαρακτηριστικά, αυτές οι ασθένειες μοιράζονται κοινά στοιχεία και ομοιότητες ως προς τους παράγοντες εκδήλωσής τους.

Η NA μοιράζεται πολλά κοινά στοιχεία με ασθένειες που αφορούν την αντίσταση στην ινσουλίνη, όπως ο ΣΔ τύπου 2, με χαρακτηριστικές τη διαταραχή στη σηματοδότηση της ινσουλίνης, τη νευροφλεγμονή, το οξειδωτικό στρες, τα τελικά προϊόντα γλυκίδωσης (AGEs), τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και το μεταβολικό σύνδρομο. Επίσης, ορισμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις για την κάθε μία δείχνουν να μπορούν να επηρεάσουν ευεργετικά την άλλη.

Η καλύτερη κατανόηση της παραγωγής του οξειδωτικού στρες και η αντιμετώπιση της NA και του ΣΔ μπορεί να προσφέρει ορισμένους νέους στόχους για θεραπεία, ενώ είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι εάν το οξειδωτικό στρες είναι η μια από τις κύριες αιτίες της παθογένεσης των 2 αυτών καταστάσεων, τότε η αντιοξειδωτική δράση του φαρμακευτικού μορίου ίσως μπορεί να έχει επίσης σημαντικό ρόλο στη θεραπεία.

1. Εισαγωγή

Τόσο η νόσος Alzheimer (NA), όσο και ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) είναι εκφυλιστικές ασθένειες που περιλαμβάνουν νευρωνική απώλεια και καταστροφή β-κυττάρων, αντίστοιχα.¹⁻⁶ Ο κύριος συστηματικός σύνδεσμος μεταξύ αυτών των ασθενειών είναι η εξασθενημένη σηματοδότηση ινσουλίνης, που οδηγεί σε νευροεκφυλισμό και γνωστικές βλάβες.⁷ Οι διαβητικοί ασθενείς έχουν υψηλότερα ποσοστά γνωστικής εξασθένησης και ως εκ τούτου διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης NA. Τόσο η υπεργλυκαιμία όσο και οι υπογλυκαιμικές καταστάσεις συμβάλλουν στη δυσλειτουργία των γνωστικών λειτουργιών και διαδικασιών. Και οι δύο καταστάσεις είναι αποτέλεσμα της αντίστασης στην ινσουλίνη και της διαταραχής διαφόρων βιολογικών διεργασιών και οδών σηματοδότησης της.⁴⁻⁶

Η παθολογία της νόσου Alzheimer από μόνη της μπορεί να οδηγήσει σε αντίσταση στην ινσουλίνη στον εγκέφαλο, ενώ γενικότερα η αντίσταση αυτή μπορεί να αποτελέσει μία παρεμβατική μεταβλητή στη νευροεκφυλιστική διαταραχή. Η υπεργλυκαιμία και η αντίσταση στην ινσουλίνη από τον διαβήτη, που επικαλύπτονται με την παθολογία της NA, επιδεινώνουν, πράγματι, την εξέλιξη των νευροεκφυλιστικών διαδικασιών.⁷ Από την άλλη, στο ΣΔ τύπου 2 (ΣΔ2), το σήμα ινσουλίνης εξασθενεί και έχει ως αποτέλεσμα την εναπόθεση γεροντικών πλακών, τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και τη φλεγμονή του αντίστοιχου ιστού. Τέτοια κοινά χαρακτηριστικά παρατηρούνται επίσης στους ασθενείς με NA. Πρόσφατες μελέτες επισημαίνουν το ρόλο της εξασθενημένης σηματοδότησης ινσουλίνης στην υπερφωσφορύλωση της πρωτεΐνης Tau, αποκαλύπτοντας μια επιπλέον σχέση μεταξύ της NA και του διαβήτη.⁸

Η βασική πτυχή του ΣΔ2 είναι η αντίσταση στην ινσουλίνη η οποία σχετίζεται με το αυξημένο επίπεδο φλεγμονωδών μεσολαβητών όπως η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP).⁹⁻¹¹ Τα αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών δεικτών συνδέονται με τη δυσλειτουργία της ανοσολογικής απόκρισης, που οδηγεί σε αντίσταση στην ινσουλίνη, ενώ η NA σχετίζεται με φλεγμονώδη απόκριση.

Αυτά τα φλεγμονώδη προϊόντα συσσωρεύονται με διαφορετικούς ρυθμούς στον εγκέφαλο ασθενών με NA, ενώ μελέτες έχουν δείξει ότι η CRP συνδέεται με τον κίνδυνο της NA.¹²

2. Οξειδωτικό στρες και συσχέτιση με NA και ΣΔ2

Το οξειδωτικό στρες παίζει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεση των δύο διαταραχών. Υπάρχουν αρκετές οδοί που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες και συνδέουν τόσο την NA όσο και τον ΣΔ2.^{13,14} Ωστόσο, ορισμένοι παθολογικοί μηχανισμοί οι οποίοι παρατηρούνται στον διαβήτη δεν είναι απαραίτητα οι ίδιοι μηχανισμοί που σχετίζονται με την NA ή οι μόνοι που σχετίζονται με την παθολογία της. Το οξειδωτικό στρες διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη των διαβητικών επιπλοκών αλλά και στην ίδια την ανάπτυξη του διαβήτη, αφ' ενός μέσω της υπερβολικής παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) και αφετέρου λόγω της μειωμένης αποικοδόμησης τους από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου.¹⁵

Η αυξημένη γλυκόζη και το αυξημένο ποσοστό των ελεύθερων λιπαρών οξέων (ΕΛΟ), συμβάλλουν στην παθοφυσιολογία του διαβήτη, μέσω διαφόρων διαδικασιών, όπως η αυτοοξειδωση της γλυκόζης, η εξασθενημένη μιτοχονδριακή παραγωγή ενέργειας και η ακόλουθη ενεργοποίηση οδών ευαίσθητων στο στρες.¹⁶ Η υπεργλυκαιμία δραστηριοποιεί αρκετές σημαντικές οδούς που ευθύνονται για τις επιπλοκές του διαβήτη. Αυτοί οι οδοί περιλαμβάνουν τα AGEs (Advanced Glycation Endproducts), και τους υποδοχείς τους (RAGE: Receptor for Advanced Glycation Endproducts), την οδό της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), την οδό των πολυολών, τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και τη φλεγμονή.

Οι πλάκες Αβ αμυλοειδούς και τα υπερ-φωσφορυλιωμένα Tau νευροϊνικά συσσωματώματα (T-NFTs) εμπλέκονται στην παραγωγή καθώς και στην προώθηση της οξειδωτικής βλάβης της NA. Οποιαδήποτε μη φυσιολογική αύξηση των ROS, λόγω της παρουσίας Αβ πλακών και NFTs, προάγει βλάβη στο μιτοχονδριακό DNA ή/και RNA, που έχει ως αποτέλεσμα μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και βλάβη των

μεμβρανών. Άλλες βλάβες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες στη ΝΑ είναι η αυτό-οξείδωση της γλυκόζης που οδηγεί στην παραγωγή AGEs και η αυξημένη εναπόθεση του Αβ-αμυλοειδούς, με αποτέλεσμα την απόπτωση, τον νευρωνικό θάνατο και την διαταραχή των συνάψεων.¹⁷ Η παρουσία των πλακών προκαλεί οξειδωτικό στρες, μέσω πολλών μηχανισμών, προκαλεί όμως και φλεγμονή, ενώ και η φλεγμονή προκαλεί και αυτή με τη σειρά της οξειδωτικό στρες. Οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις στον εγκέφαλο ως αποτέλεσμα της νευροεκφύλισης κατά την ΝΑ, αποτελούν το επίκεντρο της έρευνας της νόσου και θεωρούνται δυνητικοί διαμεσολαβητές της. Η νευροφλεγμονή λαμβάνει χώρα στα πρώιμα στάδια της ΝΑ,¹⁷ ενώ η εκδήλωσή της περιλαμβάνει την αύξηση των φλεγμονωδών κυτοκινών και την διείσδυση των μικρογλοιακών κυττάρων στην περιοχή των αμυλοειδών πλακών.¹⁸ Η νευροφλεγμονή συμβάλλει στην παθολογία της ΝΑ μέσω της πρόκλησης οξειδωτικής βλάβης, υπερφωσφορυλίωσης της tau-πρωτεΐνης, συσσώρευσης του β-αμυλοειδούς, αλλά και της πρόκλησης δυσλειτουργίας του χολινεργικού συστήματος.¹⁴

3. Μελλοντικές προοπτικές

Η καλύτερη κατανόηση της παραγωγής του οξειδωτικού στρες και η αντιμετώπιση της ΝΑ και του ΣΔ μπορεί να προσφέρει ορισμένους νέους στόχους για θεραπεία. Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι εάν το οξειδωτικό στρες είναι η μια από τις κύριες αιτίες της παθογένεσης των 2 αυτών καταστάσεων, τότε η αντιοξειδωτική δράση του φαρμακευτικού μορίου ίσως μπορεί να έχει σημαντικό ρόλο στη θεραπεία τους.

3.1. Αναστολείς συσσώρευσης AGEs

Τα τελικά προϊόντα γλυκίδωσης (AGEs) προέρχονται από τη μη ενζυμική γλυκίδωση κυρίως των πρωτεϊνών, αλλά και των λιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων από τη γλυκόζη. Τα μακρομόρια που έχουν υποστεί μετατροπές συσσωματώνονται λόγω των μεταξύ τους αντιδράσεων και δρουν ως ενεργές παγίδες, δεσμεύοντας πρωτεΐνες του πλάσματος και παρεμβαίνοντας στη φυσιολογική λειτουργία των ιστών.¹⁹

Σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ο ΣΔ και η ΝΑ, εξαιτίας της υπεργλυκαιμίας, ο προαναφερόμενος καταρράκτης διαδικασιών υπερλειτουργεί και οδηγεί στην υπερπλασία των ιστών. Αυτές προκαλούν καταστροφή σε ιστούς, όπως στον αμφιβληστροειδή χιτώνα των ματιών, στα νεύρα, στα νεφρά και στα αιμοφόρα αγγεία, καθώς και σε λοιπές πρωτεΐνες του σώματος με αποτέλεσμα τη δημιουργία «σιωπηλών φλεγμονών». Οι «σιωπηλές φλεγμονές» αποτελούν το κυριότερο αίτιο πολλών νόσων και της πρόωρης γήρανσης. Η γένεση των ελευθέρων ριζών (ιδιαίτερα της $\cdot\text{O}_2^-$), από καταστραμμένα ή δυσλειτουργούντα μιτοχόνδρια, έχει ενοχοποιηθεί ως εναρκτήριο γεγονός στην ανάπτυξη του διαβήτη και των επιπλοκών του.²⁰ Δεδομένου ότι ο ρυθμός παραγωγής των AGEs επιταχύνεται σε παθολογικές καταστάσεις, ο σχεδιασμός αναστολέων των AGEs αποτελεί κύριο ερευνητικό στόχο που θα μπορούσε να συμβάλει στην αντιμετώπιση της ανάπτυξης ή της εξέλιξης της ΝΑ και του ΣΔ2, με την ύπαρξη τριών θεραπευτικών προσεγγίσεων, την πρόληψη του σχηματισμού AGEs, τη διακοπή των σταυρωτών συνδέσμων μετά τη δημιουργία τους και την πρόληψη των αρνητικών τους αποτελεσμάτων.

3.2. Αναστολείς αναγωγής της αλδόξης (AR)

Η αναγωγή της αλδόξης (ALR2) είναι το πρώτο ένζυμο της οδού των πολυολών.²¹ Η εμπλοκή του οξειδωτικού στρες στις επιπλοκές του ΣΔ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον σχεδιασμό ενώσεων που θα περιορίζουν τη βλάβη λόγω ωσμωτικού στρες, μέσω, αναστολής της αναγωγής της αλδόξης, η οποία έχει διαπιστωθεί ότι εμπλέκεται στις χρόνιες επιπλοκές του ΣΔ. Οι αναστολείς της αναγωγής της αλδόξης (ARIs) είναι δυνατόν διατηρώντας τη φαρμακοφόρο δομή τους να αποκτήσουν, με μοριακή τροποποίηση, επιπλέον ιδιότητες αντιοξειδωτικές ή σαρωτικές επί των ελευθέρων ριζών. Η είσοδος της γλυκόζης στην οδό των πολυολών, ελαττώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του κυττάρου και αυξάνει τον σχηματισμό των AGEs, τα οποία συνδέονται με τους υποδοχείς του και προκαλούν οξειδωτικό στρες.²²

Αρκετά χρόνια μετά, σημαντικός αριθμός ανα-

στολέων AR (ARIs) έχουν ανακαλυφθεί, αλλά εξακολουθούν να παρουσιάζουν δυσκολίες, όπως προβληματική φαρμακοκινητική ή και ανεπιθύμητες ενέργειες που εμποδίζουν την διατήρησή τους στην κλινική πράξη. Η διερεύνηση για την εύρεση νέων ARIs είναι στο επίκεντρο ερευνητικών προσπαθειών, καθώς, παρά τον σημαντικό αριθμό ARIs που έχουν αναπτυχθεί, κανένα δεν έχει εγκριθεί για ευρεία κυκλοφορία στη θεραπευτική, λόγω εμφάνισης τοξικότητας ή μικρής *in vivo* αποτελεσματικότητας.²³

3.3. Νέοι Θεραπευτικοί Στόχοι για την ΝΑ

Αν και οι προσπάθειες εύρεσης νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για την αντιμετώπιση της ΝΑ είναι ραγδαίες, μέχρι και σήμερα κυκλοφορούν στο εμπόριο κυρίως δύο κατηγορίες φαρμάκων. Οι αναστρέψιμοι αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης (AChEI), ως προσπάθεια βελτίωσης της χολινεργικής μεταβίβασης εντός του ΚΝΣ και οι ανταγωνιστές των NMDA υποδοχέων, για πρόληψη των διεγερσιμοτοξικών δράσεων των NMDA γλουταμινικών υποδοχέων σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου.¹⁴ Αυτές οι κατηγορίες φαρμάκων δεν είναι ικανές να διαφοροποιούν ή να προλαμβάνουν την εξέλιξη της ασθένειας, παρά μόνο να ανακουφίζουν από τα συμπτώματα της νόσου και να προσφέρουν μέτριο βραχυπρόθεσμο όφελος.

Καθώς η ΝΑ φαίνεται ότι είναι πολυ-αιτιολογική, πιθανώς η αντιμετώπιση της να υποβοηθείται από πολυ-λειτουργικές ενώσεις που θα απευθύνονται σε αρκετές αιτίες της νόσου, όπως φλεγμονή, υπερχοληστερολαιμία και οξειδωτικό στρες.²⁴ Παρά το γεγονός ότι καταστάσεις όπως υπερχοληστερολαιμία, υπέρταση και σακχαρώδης διαβήτης αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την νόσο Alzheimer, τα αντίστοιχα φάρμακα, όπως οι στατίνες, δεν βρέθηκαν αποτελεσματικά στην παρεμπόδιση ή βελτίωση της πορείας της νόσου. Ωστόσο, θεραπεία με στατίνες στη διαχείριση λιπιδίων μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο στεφανιαίων συμβαμάτων, τα οποία σχετίζονται με ΣΔ και ΝΑ.

Το τρέχον ενδιαφέρον για τον θεραπευτικό ρόλο των στατινών στη ΝΑ, βασίζεται κυρίως στην αντι-

φλεγμονώδη δράση τους όπως παρατηρείται σε μελέτες. Σε μια από αυτές αναφέρεται ότι η σιμβαστατίνη ελάττωσε σημαντικά τα επίπεδα του Αβ40 στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με ήπια ΝΑ.²⁵ Η νευροφλεγμονή έχει προταθεί ως μηχανισμός για την παθογένεση της ΝΑ καθώς τα ενεργοποιημένα νευρογλοιακά κύτταρα, υπεύθυνα για τη διαμόρφωση του εγκεφάλου, εμπλέκονται σε διάφορες αλλοιώσεις και τελικά οδηγούν σε εγκεφαλική βλάβη, και δεύτερον, φαίνεται ότι ασθενείς με άλλη φλεγμονώδη πάθηση, όπως ρευματοειδή αρθρίτιδα, οι οποίοι υποβάλλονται σε θεραπεία με αντιφλεγμονώδη φάρμακα για δεκαετίες, έχουν μικρότερο κίνδυνο για ανάπτυξη ΝΑ.²⁶

Περαιτέρω διερεύνηση των φλεγμονωδών μηχανισμών που εμπλέκονται στη ΝΑ, έδειξε ότι η ενεργοποίηση της μικρογλοίας και των αστροκυττάρων, επάγουν την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών, κυρίως ιντερλευκίνης 1β (IL-1β) και του παράγοντα νέκρωσης όγκου α (TNF-α). Πιο συγκεκριμένα, η σηματοδότηση TNF-α έχει δείχθει ότι επιδεινώνει τόσο τη συσσωμάτωση Αβ όσο και τη φωσφορυλίωση της Tau *in vivo*, με τα επίπεδα των τελευταίων να ανευρίσκονται αυξημένα στον εγκεφαλο και στο πλάσμα ασθενών με ΝΑ.²⁷

Οι ήδη υπάρχοντες αναστολείς TNF-α (TNFI), οι οποίοι είναι εγκεκριμένοι από τον Αμερικανικό Οργανισμό Φαρμάκων και Τροφίμων (FDA), ως βιολογικά φάρμακα (μονοκλωνικά αντισώματα mAbs) για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της νόσου Crohn, της ψωριασικής αρθρίτιδας και άλλων περιφερικών φλεγμονωδών ασθενειών, μελετώνται ως μια πιθανή θεραπευτική στρατηγική για τη ΝΑ. Στα φάρμακα αυτά περιλαμβάνεται η ινφλιξιμάμπη, η αδαλιμουμάμπη, η γολιμουμάμπη, η σεργτολιζουμάμπη και η εταρνεσέπτη, ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σύντηξης, η οποία επίσης αναστέλλει τον TNF-α, με την περιφερική στόχευση της δραστηριότητας του TNF-α και την περιορισμένη διείσδυση τους από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (ΑΕΦ), να αποτελούν κύριο μειονέκτημα για την χρήση τους στη ΝΑ, αν και γίνεται προσπάθεια για ανασχεδιασμό των TNFI, έτσι ώστε να καταστεί δυνατή η διείσδυση από τον ΑΕΦ.²⁸

Με βάσει τα παραπάνω, ο σχεδιασμός φαρμάκων

κατά της ΝΑ θα μπορούσε να στοχεύει σε μόρια που φέρουν πολλαπλές δράσεις όπως αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, υποχοληστερολαιμική και υπογλυκαιμική. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη νέων πολύπλευρων θεραπευτικών στρατηγικών για τις άνοιες περιλαμβάνει χρήση αντισωμάτων, αντιφλεγμονωδών παραγόντων και αντιοξειδωτικών ουσιών.

Η λαδοστιγίλη (Ladostigil, TV-3326) είναι ένας νευροπροστατευτικός παράγοντας που διερευνάται για τη θεραπεία νευροεκφυλιστικών διαταραχών όπως η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Lewy και η νόσος του Πάρκινσον.²⁹ Λειτουργεί ως αναστρέψιμος αναστολέας ακετυλοχολινεστεράσης και βουτυρυλοχολινεστεράσης και ως μη αναστρέψιμος αναστολέας της μονοαμινοξειδάσης Β, και συνδυάζει τους μηχανισμούς δράσης παλαιότερων φαρμάκων όπως η ριβαστιγμίνη και η ρασαγίλη σε ένα μόνο μόριο.^{30,31} Εκτός από τις νευροπροστατευτικές της ιδιότητες, ενισχύει την έκφραση νευροτροφικών παραγόντων όπως του GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) και του BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) και μπορεί να είναι ικανό να αντιστρέψει ορισμένες από τις βλάβες που παρατηρούνται σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες μέσω της επαγωγής νευρογένεσης.³² Η λαδοστιγίλη έχει επίσης αντικαταθλιπτικά αποτελέσματα και μπορεί να είναι χρήσιμη για τη θεραπεία της κατάθλιψης και του άγχους που παρατηρούνται συχνά σε τέτοιες ασθένειες.^{33,34}

Οι κύριες θεραπείες που μελετώνται σε κλινικές δοκιμές στοχεύουν στην τροποποίηση της ΝΑ βάσει της παθολογίας της νόσου (disease-modifying treatments, DMTs). Πρωταρχικοί στόχοι είναι η αποτροπή ή η μείωση της εναπόθεσης γεροντικών πλακών και η μείωση της τοξικής συσσώματωσης ή της εσφαλμένης αναδίπλωσης των NFTs.

Κατά συνέπεια, τα αντι-αμυλοειδή DMTs έχουν επικεντρωθεί σε 3 κύριους μηχανισμούς δράσης.³⁵

- Προώθηση της κάθαρσης Αβ (Ανοσοθεραπεία)
- Μείωση της παραγωγής γεροντικών πλακών μέσω αναστολής της γ-εκκριτάσης και β-εκκριτάσης, τα υπεύθυνα ένζυμα για την παραγωγή του τοξικού Αβ42, ή ενίσχυση της α-εκκριτάσης, προς

σχηματισμό του μη τοξικού Αβ40

- Αναστολή της συσσώματωσης του Αβ

3.3.1. Ανοσοθεραπεία

Οι ανοσοθεραπευτικές προσεγγίσεις έχουν κυριαρχήσει τα τελευταία 15 χρόνια χωρίς όμως να έχουν ιδιαίτερα αξιοσημείωτα αποτελέσματα μέχρι στιγμής. Η ανοσοθεραπεία που στοχεύει στη μείωση των τοξικών γεροντικών πλακών φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενη όσον αφορά στη μείωση των τοξικών επιπέδων της Αβ πρωτεΐνης στον εγκέφαλο, κάτι που όμως ακόμη δεν υποστηρίζεται από κλινικές δοκιμές.

Η διέγερση της έμφυτης ανοσίας, είτε με ενεργητική, είτε με παθητική ανοσοποίηση, βελτιώνει επίσης την παθολογία της νόσου προάγοντας τη λειτουργία της μικρόγλοιας και των μακροφάγων. Συνολικά, οι στρατηγικές στόχευσης της Αβ πρωτεΐνης φαίνονται πολλά υποσχόμενες εάν χρησιμοποιούνται πολύ νωρίς στην εξέλιξη της νόσου, πριν από την παρουσία συμπτωμάτων. Για αυτό τον λόγο, αναπτύσσονται σε τρέχουσες κλινικές δοκιμές στην πρώιμη φάση της νόσου, ενώ οι στρατηγικές που στοχεύουν στην παθολογική πρωτεΐνη Tau, αν και πολλά υποσχόμενες, φέρουν αρκετούς κινδύνους. Με την προϋπόθεση ότι σε σποραδική καθυστέρημένη έναρξη της ΝΑ, η παθολογία των πρωτεϊνών Tau και Αβ θα μπορούσε να εξελιχθεί σε ξεχωριστές οδούς, που μπορούν να επηρεάσουν η μία την άλλη συνεργιστικά,³⁶ είναι πιθανό, οι ανοσοθεραπείες της ΝΑ να μπορούν να στοχεύουν ταυτόχρονα την παθολογία τόσο της πρωτεΐνης Tau, όσο και του πεπτιδίου Αβ.³⁷

Διάφορα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της τοξικής μορφής της β-αμυλοειδούς πρωτεΐνης, που συσσωρεύεται στον εγκέφαλο, των ατόμων με ΝΑ, βρίσκονται σε κλινικές μελέτες φάσης III, συμπεριλαμβανομένων των aducanumab, gantenerumab, και BAN2401, για πρόδρομα στάδια ή σε πολύ ήπιες καταστάσεις της νόσου. Η μελέτη στοχεύει στην δέσμευση και εξουδετέρωση του β-αμυλοειδούς, αλλά και στην «επισήμανση» του Αβ42, έτσι ώστε να κινητοποιηθεί το ανοσοποιητικό σύστημα εναντίον τους. Τα αποτελέσματα που έχουν δημοσιευθεί για μία από αυτές τις δοκιμές (NCT01230853) δείχνουν

ότι το BAN2401 ήταν αρκετά ασφαλές και καλώς ανεκτό σε διάφορες δόσεις, ενώ τα αποτελέσματα του solanezumab δεν έδωσαν το ίδιο ενθαρρυντικά αποτελέσματα.^{38,39}

Η ανοσοποίηση με αντισώματα anti-tau ή με tau-πεπτίδια, ίσως θα μπορούσε να απομακρύνει τα συσσωματώματα και να βελτιώσει τη γνωστική ικανότητα του ατόμου, κάτι το οποίο μας δίνει νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις προς διερεύνηση. Η προοδευτική εξάπλωση της πρωτεΐνης Tau από τη μία περιοχή του εγκεφάλου σε μια άλλη πιστεύεται ότι προκαλείται από εξωκυτταρική διασυναπτική μετάδοση λανθασμένης T-πρωτεΐνης μεταξύ των νευρώνων. Προκλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα αντισώματα κατά της Tau μπορούν να αποτρέψουν αυτήν τη μεταφορά των λανθασμένων Tau πρωτεϊνών μεταξύ των νευρώνων. Κατά αυτό τον τρόπο τα αντισώματα anti-tau έχουν τη δυνατότητα να σταματήσουν ή να επιβραδύνουν την εξέλιξη της NA ή οποιασδήποτε άλλης ασθένειας σχετίζεται με την υπερφωσφορύλωση της tau.

Σε μια άλλη στρατηγική η ανάπτυξη και η είσοδος στην κλινική πράξη εκλεκτικών αναστολέων της β- ή γ-σεκρετάσης ή αναστολέων της συσσωμάτωσης του β-αμυλοειδούς είναι πολύ επιθυμητή και ελπιδοφόρα. Παρά την έρευνα που γίνεται τη τελευταία δεκαετία κανένα από τα ελπιδοφόρα φάρμακα δεν έχει εγκριθεί, ενώ πολλά ανάπτυξαν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες κατά την διάρκεια των κλινικών δοκιμών. Σύμφωνα με την υπόθεση του αμυλοειδούς, η αμυλοειδογενής οδός προωθείται μετά τη διαδοχική διάσπαση της APP από β-εκκριτάση και γ-εκκριτάση. Κατά συνέπεια, οι ρυθμιστικές αυτές ουσίες, αλλάζουν τη δράση του ενζύμου ώστε να μπλοκάρεται μόνο η παραγωγή των τοξικών πεπτιδίων του Αβ-αμυλοειδούς και όχι όλων των μορφών αμυλοειδούς.⁴⁰ Ωστόσο, η εφαρμογή αναστολέων της γ-σεκρετάσης ως θεραπευτική στρατηγική θα πρέπει να είναι αρκετά προσεκτική, γιατί το ενζυμο αυτό συμμετέχει και σε άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως το μονοπάτι Notch, που με τη σειρά τους καθορίζουν την κυτταρική διαφοροποίηση και ανάπτυξη και έτσι θα πρέπει να αποφευχθούν πιθανές τέτοιες ανε-

πιθύμητες ενέργειες.^{35,40} Ως εκ τούτου, οι κλινικές μελέτες στρέφονται στην αναστολή της β-σεκρετάσης-1 (BACE1), ωστόσο, οι κλινικές δοκιμές με τους αναστολείς BACE, lanabecestat, verubecestat, και atabecestat, έχουν διακοπεί πρόσφατα λόγω απροσδόκητων δυσκολιών, όπως έλλειψης αποτελεσματικότητας, καθώς και για λόγους ασφάλειας, όπως εξανθήματα, τοξικότητα στο ήπαρ και νευροψυχιατρικά συμπτώματα.^{35,41,42} Σχετικά με την επαγωγή της δραστηριότητας της α-εκκριτάσης, η δραστηριότητα του ενζύμου έχει θεωρηθεί ως ένας κύριος θεραπευτικός στόχος για τη NA, καθώς προωθεί την μη αμυλοειδογενή οδό του Αβ40. Ωστόσο, λίγα δεδομένα είναι γνωστά για τις κύριες οδούς σηματοδότησης που θα μπορούσαν να διεγείρουν τη διάσπαση της APP με την α-σεκρετάση. Πιθανόν, η ενεργοποίηση της προωθείται μέσω της οδού PI3K / Akt και μέσω σηματοδότησης του υποδοχέα γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA). Έτσι, οι παράγοντες που ενεργοποιούν το μονοπάτι PI3K / Akt ή δρουν ως εκλεκτικοί ρυθμιστές του υποδοχέα GABA, έχουν προταθεί ως πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι για την NA.^{43,44}

Οι APH-1105 και ID1201 ενεργοποιούν την οδό PI3K / Akt και βρίσκονται σε κλινικές μελέτες φάσης 2 για αξιολόγηση τους σε ήπια έως μέτρια νόσο. Το Etazolate (EHT0202) διεγείρει τη μη αμυλοειδογόνο οδό της α-εκκριτάσης ως εκλεκτικός διαμορφωτής των υποδοχέων GABA. Κλινικές δοκιμές φάσης 2, έδειξαν ότι ο παράγοντας ήταν ασφαλής και καλά ανεκτός σε ασθενείς με ήπια έως μέτρια νόσο. Ωστόσο, η περαιτέρω αξιολόγηση του etazolate σε δοκιμές φάσης 3 δεν έχει προχωρήσει. Το Etazolate, επί του παρόντος, αξιολογείται σε προκλινικές μελέτες για την προληπτική του δράση σε διαταραχή μετατραυματικού στρες.⁴⁵

4. Αντιδιαβητικά φάρμακα ως πιθανές θεραπείες για τη NA

Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, υποστηρίζεται ότι η NA αντιπροσωπεύει μια νευροενδοκρινική διαταραχή που μοιάζει με μια μοναδική μορφή ΣΔ2 που συνοδεύεται από νευροεκφυλισμό, ο οποίος μερικές φορές χαρακτηρίζεται ως διαβήτης τύπου

III. Προερχόμενοι από αυτήν την υπόθεση, ορισμένοι παράγοντες που βελτιώνουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη και μειώνουν την υπερινσουλιναιμία έχουν προταθεί για να βοηθήσουν τη γνωστική λειτουργία σε ασθενείς με ΣΔ2 ή ΝΑ. Πολλές έρευνες παρουσιάζουν τη ΝΑ ως μια μεταβολική νόσο του εγκεφάλου. Η κοινή παθοφυσιολογία της με τον ΣΔ2 δίνει το έναυσμα να σχηματιστούν θεωρίες σχετικά με την αποτελεσματικότητα των αντιδιαβητικών φαρμάκων που έχουν εγκριθεί για τον ΣΔ2, στην αντιμετώπιση της νόσου.⁴⁶ Μεγάλος αριθμός ερευνών έχει πραγματοποιηθεί ώστε να εξεταστεί το εύρος της επίδρασης των αντιδιαβητικών φαρμάκων στις παθολογικές εκφάνσεις της ΝΑ,^{47,48} ενώ οι έρευνες σε ζώα παρουσιάζουν αποτελέσματα που αφορούν πιθανές θετικές επιδράσεις στην παθολογία της tau-πρωτεΐνης και του β-αμυλοειδούς, στη νευρογένεση, στο οξειδωτικό στρες, στη λειτουργία των συνάψεων, στην γνωστική λειτουργία και στη νευροφλεγμονή.

Ορισμένα αντιδιαβητικά φάρμακα πιθανότατα να αποτελούν νευροπροστατευτική θεραπευτική προσέγγιση ενάντια στη ΝΑ, με σημαντικότερα ευρήματα ωστόσο να εμφανίζονται σε άτομα με ήπια γνωστική εξασθένηση (MCI). Παρακάτω, συνοψίζουμε μερικά από τα στοιχεία από προκλινικές και κλινικές μελέτες.

4.1. Ενδορινική ινσουλίνη

Αρκετές μελέτες έχουν καταδείξει, ότι η χορήγηση ινσουλίνης σε ασθενείς με ΝΑ μειώνει τη δράση των κινάσων που προάγουν την υπερφωσφορυλίωση της tau-πρωτεΐνης, ενισχύει την κάθαρση του β-αμυλοειδούς και την συναπτική πλαστικότητα.⁴⁶

Η θεραπεία με ανάλογα ινσουλίνης οδήγησε σε αλλαγές στα επίπεδα του υποδοχέα ινσουλίνης του ιππόκαμπου.³⁴ Οι πρώτες κλινικές μελέτες έδειξαν ότι η υπερινσουλιναιμία, χωρίς υπεργλυκαιμία, ενισχύει τη μνήμη σε ενήλικες με ΝΑ, υποδηλώνοντας σημαντικό ρόλο αυτής της ορμόνης στις διαδικασίες της μνήμης.⁴⁹ Ωστόσο, η συστηματική χορήγηση ινσουλίνης σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο υπογλυκαιμίας και μειωμένη διείσδυση στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Ως εκ τούτου, η ενδορινική

χορήγηση ινσουλίνης έχει δοκιμαστεί σε αρκετές μελέτες, με σκοπό την άμεση στόχευση του εγκεφάλου.⁵⁰ Προκλινικά στοιχεία έδειξαν ότι η ινσουλίνη που χορηγείται ενδορινικά είναι ικανή να περάσει τον ΑΕΦ και μεταγενέστερες μελέτες σε ανθρώπους έχουν δείξει ότι μετά από ενδορινική χορήγηση ινσουλίνης, μια σημαντική ποσότητα αυτής φτάνει στον εγκέφαλο σε λειτουργικά ενεργή κατάσταση.⁵¹ Αν και υπάρχουν αρκετές μελέτες που αποδεικνύουν ότι η θεραπεία με ινσουλίνη, και συγκεκριμένα μέσω ενδορινικής χορήγησης, παρουσιάζει βελτιώσεις όσον αφορά τις γνωστικές ικανότητες των ασθενών με ΝΑ, ωστόσο, για την σταθεροποίηση της ενδορινικής ινσουλίνης ως θεραπείας, απαιτείται η διαλεύκανση του ρόλου που διαδραματίζει ο γενετικός παράγοντας στη ρύθμιση των αποκρίσεων των ασθενών μετά την χορήγηση, καθώς και η περαιτέρω διερεύνηση της συγκεκριμένης δόσης που χρειάζεται ο καθένας για να υπάρξουν οι επιθυμητές βελτιώσεις.

4.2. Μετφορμίνη

Προκλινικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι η από του στόματος χορηγούμενη μετφορμίνη διασχίζει γρήγορα τον ΑΕΦ και συσσωρεύεται στο ΚΝΣ σε διαφορετικά επίπεδα.⁵² *In vitro* πειράματα σε νευρωνικές κυτταρικές σειρές, υπό παρατεταμένες υπερινσουλιναιμικές καταστάσεις, έδειξαν ότι η θεραπεία με μετφορμίνη ήταν ικανή να επανευαισθητοποιήσει τη σηματοδότηση ινσουλίνης και να αποτρέψει τις μοριακές και παθολογικές μεταβολές που παρατηρήθηκαν στους νευρώνες των ατόμων με ΝΑ.⁵³ Εργαστηριακά και κλινικά δεδομένα υποστηρίζουν την υπόθεση πως μια ικανοποιητική εξήγηση για τη δράση της μετφορμίνης είναι η ικανότητα της να μειώνει τα τοξικά δικαρβονύλια, το σχηματισμό των AGEs και τη Tau φωσφορυλίωση.^{54,55} Δεδομένης της ευρείας χρήσης της μετφορμίνης και της επίδρασής της στις γνωστικές λειτουργίες, χρειάζεται πρόσθετη έρευνα και συγκεκριμένα, μια διαχρονική μελέτη, με επαρκές δείγμα και μετα-ανάλυση των μικρότερων ερευνών που διεξάγονται, με σκοπό την περαιτέρω διαλεύκανση της δράσης της.

4.3. Θειαζολιδινодиόνες (PPARγ αγωνιστές) και ινκρετίνες

Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς πολλαπλασιασμού των υπεροξυσωματίων (PPAR, peroxisome proliferator activated receptors) είναι μεταγραφικοί παράγοντες για πυρηνικούς ορμονικούς υποδοχείς, που σχετίζονται με την μεταβολική ομοιοστάση, και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των πρωτεϊνών, των υδατανθράκων και των λιπιδίων, καθώς επίσης και στη ρύθμιση των φλεγμονωδών αποκρίσεων (μειώνουν τα επίπεδα της IL-6 και άλλους μεσολαβητές φλεγμονής).⁵² Κατά συνέπεια, οι εκλεκτικοί αγωνιστές τους, όπως η πιogliταζόνη (PPARγ), αποτελούν μια πιθανή θεραπεία του ΣΔ2 και της αντίστασης στην ινσουλίνη του εγκεφάλου, ενώ τα τελευταία στοιχεία των ερευνών, υποστηρίζουν ότι PPARγ αγωνιστές έχουν την δυνατότητα να ενεργοποιήσουν τις οδούς στον εγκέφαλο που ρυθμίζονται από τον ινσουλινόμορφο αναπτυξιακό παράγοντα (IGF-1).^{56, 57} Ως εκ τούτου, η θεραπεία με PPAR γ αγωνιστές, πέραν της χρησιμότητας της στην αντιμετώπιση του ΣΔ2, ελαττώνει, επίσης, τα επίπεδα των φλεγμονωδών δεικτών, των τριγλυκεριδίων, των ΕΛΟ, της γλυκόζης και της χοληστερολής.⁵⁸

Αντίστοιχα, ο ρόλος που διαδραματίζουν οι ινκρετίνες και τα ανάλογα ινκρετίνης στον εγκέφαλο είναι νευροπροστατευτικός, εφόσον ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη μνήμη, τη συναπτική πλαστικότητα, ενώ δείχνουν να μειώνουν τις πλάκες του β-αμυλοειδούς, το οξειδωτικό στρες και την φλεγμονή.^{59,60}

5. Η φαρμακευτική αγωγή της ΝΑ ως πιθανή θεραπεία για το ΣΔ

Η φλεγμονή μπορεί να προωθήσει τη δυσλιπιδαιμία, την υπερβολική κοιλιακή παχυσαρκία, τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης νηστείας και την υψηλή αρτηριακή πίεση, όλα τα τυπικά χαρακτηριστικά που υπάρχουν στο μεταβολικό σύνδρομο. Η χρόνια φλεγμονή, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην αιτιοπαθολογία όσο και στην εμφάνιση των επιπλοκών του

ΣΔ2 και της ΝΑ. Η υπεργλυκαιμία που χαρακτηρίζει το ΣΔ φαίνεται πως αποτελεί το εναρκτήριο ερέθισμα για την ανάπτυξη των φλεγμονωδών διεργασιών, δημιουργώντας ένα φαύλο κύκλο, που τελικά θα προκαλέσουν-ενισχύσουν την αγγειακή βλάβη και την αθηρωμάτωση.

Δεδομένου ότι το μεταβολικό σύνδρομο είναι μια κατάσταση, που σχετίζεται με την παχυσαρκία, που μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο ανάπτυξης ΣΔ2, καθώς και καρδιαγγειακών συμβαμάτων (CVD), οι αναστολείς της AchE, και πιο ειδικά η γαλανταμίνη, μέσω της αντιφλεγμονώδους δράσης της μπορεί να έχει ευεργετικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση του συνδρόμου.

Η γαλανταμίνη, πέραν της κεντρικής της δράσης ως αναστολέας της AchE, έδειξε αντιφλεγμονώδη δράση που βελτίωσε την ευαισθησία στην ινσουλίνη και άλλους δείκτες φλεγμονής σε παχύσαρκους ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο.⁶¹ Με σκοπό να καθοριστεί η κλινική αποτελεσματικότητα των αναστολέων της AchE, σε ασθενείς με ΣΔ και άνοια, πραγματοποιήθηκε μια μεγάλη μελέτη χρήσης αναστολέων AchE σε ασθενείς που είχαν διαγνωστεί με ΝΑ και άνοια μικτής παθολογίας που είχαν εγγραφεί στο Σουηδικό Μητρώο Άνοιας έως τον Δεκέμβριο του 2015. Συνολικά, αναγνωρίστηκαν 3176 (14%) ασθενείς με ΣΔ και 19484 ασθενείς χωρίς ΣΔ. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η χρήση της donepezil και της γαλανταμίνης συσχετίστηκε με μειωμένη θνησιμότητα τόσο σε ασθενείς με ΣΔ όσο και σε ασθενείς χωρίς ΣΔ. Η donepezil συσχετίστηκε περαιτέρω με τη μείωση της καρδιαγγειακής θνησιμότητας, ωστόσο μόνο σε ασθενείς χωρίς ΣΔ, ενώ γενικότερα, η χρήση των αναστολέων AchE συσχετίστηκε με 48% μείωση της θνησιμότητας που σχετίζεται με τον διαβήτη.⁶²

6. Επιπτώσεις ψυχοδραστικών φαρμάκων στη ΝΑ

Οι διαταραχές της συμπεριφοράς και οι ψυχολογικές διαταραχές αποτελούν κοινές επιπλοκές σε διάφορους τύπους άνοιας, όπως η ΝΑ. Η ψύχωση, η διέγερση, οι διαταραχές της διάθεσης και η κατάθλιψη είναι μερικές μορφές εκδήλωσης των συ-

μπεριφορικών και ψυχολογικών συμπτωμάτων της άνοιας (BPSD). Εμφάνιση τέτοιων διαταραχών συνήθως υποδηλώνει ταχύτερη πρόοδο της νόσου και υψηλότερο κίνδυνο θνησιμότητας και λοιπών καρδιαγγειακών επιπλοκών. Οι κλινικές οδηγίες συνιστούν μη φαρμακολογική παρέμβαση ως πρώτη αντιμετώπιση των διαταραχών. Ωστόσο, αν τα συμπτώματα δεν υποχωρούν με την πάροδο του χρόνου και τις εναλλακτικές μορφές θεραπείας, είναι απαραίτητη η φαρμακολογική παρέμβαση. Δυστυχώς, η υπάρχουσα φαρμακευτική αγωγή των BPSD, η οποία περιλαμβάνει αντιψυχωσικά, αντικαταθλιπτικά και βενζοδιαζεπίνες, δεν είναι ικανοποιητική, καθώς σχετίζεται με υψηλό κίνδυνο ανεπιθύμητων ενεργειών και αυξημένη θνησιμότητα.⁶³

6.1. Αντικαταθλιπτικά

Οι εκλεκτικοί αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRIs), κυρίως η σερτραλίνη, η σιταλοπράμη και η εσιταλοπράμη, έχουν ήπια αποτελεσματικότητα και καλή ανοχή, ιδιαίτερα σε χαμηλές δόσεις.⁶⁴ Αναλύσεις για την επίδραση των αντικαταθλιπτικών στα νευροψυχιατρικά συμπτώματα, εκτός από την κατάθλιψη, σε ασθενείς με άνοια, σε ελεγχόμενες μελέτες με εικονικό φάρμακο, έδειξαν ότι η θεραπεία με σερτραλίνη και σιταλοπράμη σχετίζεται με σημαντική μείωση της διέγερσης του ασθενούς.⁶⁵ Συγκεκριμένα, η σιταλοπράμη, σε σχετικά χαμηλή δόση, για χρήση έναντι μικρής διέγερσης, σε ασθενείς με ήπιο βαθμό γνωστικής εξασθένησης, είχε καλή αποτελεσματικότητα και ανεκτικότητα. Αντίθετα, ασθενείς με σοβαρή διέγερση και σοβαρό γνωστικό έλλειμμα, ανέπτυξαν σε μεγάλο βαθμό δυσμενείς επιπτώσεις. Η σιταλοπράμη συνέβαλε στην μείωση του άγχους, των ψευδαισθήσεων και στην σταθεροποίηση της συναισθηματικής αστάθειας. Ωστόσο, σε υψηλές δόσεις επιδείνωσε τις γνωστικές λειτουργίες και προκάλεσε ελαφρά παράταση του διαστήματος QTc στο ηλεκτροκαρδιογράφημα (ΗΚΓ),⁶⁵ ενώ γενικά η χορήγηση σιταλοπράμης και εσιταλοπράμης, σε υψηλότερες δόσεις, δεν συνιστάται σε ηλικιωμένους ασθενείς με άνοια, δεδομένου του κινδύνου παράτασης του διαστήματος QTc.^{66,67} Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της θεραπείας με SSRI,

είναι απαραίτητο να παρακολουθείται ο κίνδυνος ανάπτυξης υπονατριαιμίας, ναυτίας, εμέτου, διάρροιας, τρόμου, αιμορραγίας του γαστρεντερικού συστήματος και καταστολής του ΚΝΣ (υπνηλία), καθώς και πιθανές μεταβολές του βάρους που μπορεί να επιτείνουν καρδιομεταβολικά σύνδρομα.

6.2. Αντιψυχωσικά

Η χρήση τους πρέπει να περιορίζεται, μόνο ύστερα από αποκλεισμό άλλων φαρμακευτικών ή μη παρεμβάσεων. Ωστόσο, στην πράξη, τα αντιψυχωσικά συνταγογραφούνται συχνότερα, από τις υπόλοιπες θεραπείες. Πριν από την έναρξη της αντιψυχωσικής αγωγής, είναι απαραίτητη η καρδιαγγειακή αξιολόγηση του ασθενούς για εξατομίκευση της θεραπείας και για διερεύνηση παθολογικών χαρακτηριστικών που ενδέχεται να επιβαρυνθούν από την εν λόγω αντιψυχωσική αγωγή, μεταξύ των οποίων είναι και ο ΣΔ. Κατά την επιλογή του φαρμάκου, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική αλληλεπίδραση με αναστολείς AChE και μεμαντίνη. Ο μεταβολισμός της δονεπεζίλης και της γαλανταμίνης θα μπορούσε να επηρεαστεί από υποστρώματα, επαγωγείς ή αναστολείς του κυτοχρώματος CYP2D6 και CYP3A4.⁶⁸

Οι οδηγίες συνιστούν πάντα εκκίνηση της θεραπείας με την χαμηλότερη αποτελεσματική δόση αντιψυχωσικού και σταδιακή τιτλοποίηση στο μέγιστο δυνατό. Κατά τη διάρκεια της θεραπείας είναι απαραίτητη η παρακολούθηση του ασθενούς τακτικά. Δεδομένης της χαμηλότερης εμφάνισης εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων (δυστονία και όψιμη δυσκινησία), τα νεότερα αντιψυχωσικά είναι καλύτερα ανεκτά, με τα πρόσφατα ευρήματα να υποδηλώνουν τη ρισπεριδόνη και την ολανζαπίνη ως φάρμακα εκλογής για τη διαχείριση της ψύχωσης και της επιθετικότητας σε ασθενείς με άνοια.⁶⁹ Οι δεύτερης γενιάς παράγοντες χρησιμοποιούνται γενικά ως θεραπεία πρώτης γραμμής ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος των εξουθενωτικών εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων που σχετίζονται με τα φάρμακα πρώτης γενιάς, τα οποία δρουν κατά κύριο λόγο στον D2 υποδοχέα της ντοπαμίνης, αλλά σχετίζονται με υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης μετα-

βολικών ανεπιθύμητων ενεργειών, όπως ο διαβήτης, η υπερχοληστερολαιμία και η αύξηση βάρους.⁷⁰

Το 2005, ο FDA εξέδωσε προειδοποίηση σχετικά με την αυξημένη θνησιμότητα των ασθενών με άνοια και BPSD, που έλαβαν θεραπεία με αντιψυχωσικά. Ακολούθησε η ίδια προειδοποίηση από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA). Οι πληροφορίες συμπεριλήφθηκαν στη σύνοψη των χαρακτηριστικών του προϊόντος (SPC) των αντιψυχωσικών. Η προειδοποίηση βασίστηκε στα αποτελέσματα δημοσιευμένων και μη δημοσιευμένων δεδομένων και, ιδίως, στο συμπέρασμα μιας μετα-ανάλυσης 17 τυχαιοποιημένων ελεγχόμενων μελετών, η οποία διαπίστωσε ότι υπήρχε περίπου διπλάσιος κίνδυνος θνησιμότητας κατά τη διάρκεια της θεραπείας με ολανζαπίνη, ρισπεριδόνη, κουετιαπίνη και αριπιπραζόλη σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο.^{71,72}

Το Pimavanserin είναι ένας εκλεκτικός σεροτονινεργικός αγωνιστής του υποδοχέα 5-HT, το οποίο εγκρίθηκε τον Απρίλιο του 2016 από το FDA για τη θεραπεία των ψευδαισθήσεων. Το Pimavanserin αναπτύχθηκε για ψύχωση, διέγερση και επιθετικότητα στη ΝΑ. Μελετάται, επίσης, για σχιζοφρένεια, κατάθλιψη και ψύχωση που σχετίζεται με την άνοια όλων των αιτιών. Πιστεύεται ότι έχει λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες από τους παλαιότερους αντιψυχωσικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της ψύχωσης, αλλά τα στοιχεία παραμένουν περιορισμένα. Το φάρμακο φέρει προειδοποίηση μαύρου κουτιού (black box warning) για αυξημένη θνησιμότητα σε ηλικιωμένους. Επηρεάζει τους καρδιακούς ρυθμούς και δεν πρέπει να χρησιμοποιείται από άτομα με αρρυθμία ή που λαμβάνουν φάρμακα που παρατείνουν το διάστημα QT. Οι πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες που παρατηρήθηκαν σε δοκιμές ήταν περιφερειακό οίδημα, ναυτία, σύγχυση, παραισθήσεις, δυσκοιλιότητα και διαταραχή βάρους, ενώ συσχετίστηκε με απότομη

αύξηση βάρους και πιθανή αύξηση της γλυκόζης του αίματος.⁷³

7. Συμπεράσματα

Η επίδραση του οξειδωτικού στρες, τόσο στο ΣΔ2 όσο και στη ΝΑ, αποτελεί σημαντικό κομμάτι στην παθοφυσιολογία των νόσων. Η εμπλοκή του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής καθώς και η παθογένεια των δύο νόσων μπορεί να χρησιμοποιηθούν για το σχεδιασμό φαρμακομοριών που αποτρέπουν την έναρξη και την εξέλιξη τους. Η κοινή παθογένεση και η επίδραση του οξειδωτικού στρες μπορούν να προσφέρουν ιδέες για το σχεδιασμό και σύνθεση αποτελεσματικότερων φαρμακομοριών, με σημαντικό κλινικό αντίκτυπο, ή στην εμφάνιση νέων ενδείξεων ήδη γνωστών φαρμάκων.

Η θεραπεία της ΝΑ μέσω αντιδιαβητικών φαρμάκων, που έχουν άμεση επίδραση στον εγκεφαλικό ιστό, αποτελεί επίσης τομέα προς διερεύνηση. Η παρούσα μελέτη στοχεύει προς την κατεύθυνση αυτή, καθώς μέσω ανάλυσης των μηχανισμών και των πλειοτροπικών σηματοδοτικών διαδικασιών που εμπλέκονται στις δύο αυτές νόσους θα μπορούσαν φαρμακευτικές ενώσεις, ειδικά ενώσεις με πολλούς στόχους δράσης, να δράσουν ποικιλοτρόπως βελτιώνοντας τα ελλείμματα της νόσου. Σήμερα γίνεται εντατική έρευνα για την ανακάλυψη αποτελεσματικών φαρμάκων, επί των δύο παθήσεων, για πολλούς λόγους, όπως ο πολύ μεγάλος αριθμός πασχόντων, κυρίως στις ανεπτυγμένες κοινωνίες, η ταχύτατη εξέλιξη των νόσων και διότι καθίσταται σοβαρό κοινωνικό και οικονομικό πρόβλημα, ενώ η αντιμετώπιση τους αποτελεί μια σπουδαία φαρμακευτική πρόκληση που οφείλει να αντιμετωπιστεί επιτυχώς, υπό το πρίσμα της πολυφαρμακίας που οδηγεί σε επιδείνωση των συμπτωμάτων τους και απαιτεί την ανεύρεση φαρμάκων που θα στοχεύουν σε διάφορους πυλώνες των παθήσεων. □

Diabetes in Alzheimer disease Interaction at mechanistic and therapeutic level

Theodosios-Nobelos Panagiotis,* Kokkinos Stavros, Triantis Charalampos

Pharmacy Department, School of Health Sciences, Frederick University, Nicosia, Cyprus

KEYWORDS:

Diabetes; Alzheimer
Disease; Antidiabetic
Drugs

CORRESPONDING AUTHORS:

Dr Theodosios-Nobelos Panagiotis

Email: hsc.np@frederick.ac.cy

Tel: +357 22394394

7 Y. Frederickou Str., Nicosia 1036

Cyprus

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) and diabetes mellitus (DM) are among the most common diseases associated with aging. AD is known to be characterized by the deposition of fibrils of beta-amyloid peptide (A β amyloid plaques) and the accumulation of the hyperphosphorylated Tau protein (neurofibrillary tangles-NFT), inside the neurons, that lead to neuronal degeneration and dysfunction in the brain. Diabetes, on the other hand, is characterized by impaired insulin signaling, leading to reduced glucose uptake and metabolic suppression of energy-consuming cells. Despite their distinctive features, these diseases share commonalities and could be thought of as similar disorders, as far as their cytotoxic mechanisms of development are concerned. In this review, some of the fundamental characteristics of each of the two diseases are described and similarities in their pathophysiology are pointed out. After examining the pathophysiology of these two diseases, we will discuss the possible innovative therapeutic approaches, especially in AD, and the future prospects arising from this rapidly emerging field, for which the development of drug molecules has proven to be particularly difficult.

Epidemiological research data have shown a strong link between DM2 and AD, and the exact mechanism behind this increased risk has not yet been discovered. The effect of oxidative stress on both DM2 and AD is undoubtedly an important part of the pathophysiology of the diseases. The involvement of oxidative stress and inflammation and the pathogenesis of both diseases can be used in order to design drug molecules that prevent the onset and progression of such diseases. The common pathogenesis and the effect of oxidative stress may provide ideas for the design and synthesis of more effective pleiotropically acting drugs or new applications of some already existing drugs.

References

1. Bedse G., Di Domenico F., Serviddio G., Cassano T. Aberrant insulin signaling in Alzheimer's disease: current knowledge. *Front. Neurosci.* 9, 204, 2015.
2. Zheng H., Wu J., Jin Z., Yan L.J. Protein Modifications as Manifestations of Hyperglycemic Glucotoxicity in Diabetes and Its Complications. *Biochem. Insights.* 9, 1-9, 2016.
3. Birks J.S., Harvey R.J. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 6, CD001190, 2018.
4. Rosales-Corral S., Tan D.X., Manchester L., Reiter R.J. Diabetes and Alzheimer disease, two overlapping pathologies with the same background: oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2015, 985845, 2015.
5. Biessels G.J., Kappelle A.C., Bravenboer B., Erkelens D.W., Gispen W.H. Cerebral function in diabetes mellitus. *Diabetologia.* 37, 643-50, 1994.
6. Takeuchi M., Yamagishi S-I. Possible involvement of advanced glycation end-products (AGEs) in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.* 14, 973-8, 2008.
7. Biessels G., Kappelle L. Increased risk of Alzheimer's disease in type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? *Biochem Soc Trans.* 33, 1041-4, 2005.
8. Wang J., Yang X., Zhang J. Bridges between mitochondrial oxidative stress, ER stress and mTOR signaling in pancreatic beta cells. *Cell Signal.* 28, 1099-104, 2016.
9. An Y., Varma V.R., Varma S., Casanova R., Dammer E., Pletnikova O. et al. Evidence for brain glucose dysregulation in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 14, 318-329, 2018.
10. Langbaum J.B., Chen K., Caselli R.J., Lee W., Reschke C., Bandy D. et al. Hypometabolism in Alzheimer-affected brain regions in cognitively healthy Latino individuals carrying the apolipoprotein E epsilon4 allele. *Arch Neurol.* 67, 462-8, 2010.
11. Hak A.E., Pols H.A., Stehouwer C.D., Meijer J., Kiliaan A.J., Hofman A. et al. Markers of inflammation and cellular adhesion molecules in relation to insulin resistance in nondiabetic elderly: the Rotterdam study. *J Clin Endocrinol Metab.* 86, 4398-405, 2001.
12. van de Ree M.A., Huisman M.V., Princen H.M., Meinders A.E., Kluft C. DALI-Study Group. Strong decrease of high sensitivity C-reactive protein with high-dose atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis.* 166, 129-35, 2003.
13. Mittal K., Katare D.P. Shared links between type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease: A review. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* 10, S144-S149, 2016.
14. Papagiouvannis G., Theodosios-Nobelos P., Kourounakis P.N., Rekka E.A. Multi-Target Directed Compounds with Antioxidant and/or Anti-Inflammatory Properties as Potent Agents for Alzheimer's Disease. *Med Chem.* 17, 1086-1103, 2021.
15. Guzik T.J., West N.E., Black E., McDonald D., Ratnatunga C., Pillai R. et al. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res.* 86, E85-90, 2000.
16. Ceriello A., Mercuri F., Quagliaro L., Assaloni R., Motz E., Tonutti L. et al. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia.* 44, 834-8, 2001.
17. Prasad M.R., Lovell M.A., Yatin M., Dhillon H., Markesbery W.R. Regional membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 23, 81-8, 1998.
18. Roberts L.J., Morrow J.D.. Measurement of F 2-isoprostanes as an index of oxidative stress *in vivo*. *Free Radic Biol Med.* 28, 505-13, 2000.
19. Montecalvo M.A., de Lencastre H., Carraher M., Gedris C., Chung M., VanHorn K. Natural history of colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 16, 680-5, 1995.

20. Nicholl I.D, Bucala R. Advanced glycation end-products and cigarette smoking. *Cell Mol Biol* 44, 1025-33, 1998.
21. Chatzopoulou M., Alexiou P, Kotsampasakou E., Demopoulos V.J. Novel aldose reductase inhibitors: a patent survey (2006 – present), *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 22, 1303-1323, 2012.
22. Stefek M., Soltesova Prnova M., Majekova M., Chris Rechlin C., Heine A., Klebe G. Identification of Novel Aldose Reductase Inhibitors Based on Carboxymethylated Mercaptotriazinoindole Scaffold *J Med Chem* 58, 2649–2657, 2015.
23. Hu X., Li S., Yang G., Liu H., Boden G., Li L. Efficacy and Safety of Aldose Reductase Inhibitor for the Treatment of Diabetic Cardiovascular Autonomic Neuropathy: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 9, e87096, 2014.
24. Theodosis-Nobelos P, Papagiouvanis G., Panteidou M., Kourounakis P.N., Athanasekou C., Reka E.A. Design, Synthesis and Study of Nitrogen Monoxide Donors as Potent Hypolipidaemic and Anti-Inflammatory Agents. *Molecules* 25, 19, 2019.
25. Simons M., Schwärzler F., Lütjohann D., von Bergmann K., Beyreuther K., Dichgans J. et al. Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: A 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Ann Neurol.* 52, 346-50, 2002.
26. McGeer P.L., Rogers J., McGeer E.G. Inflammation, antiinflammatory agents, and Alzheimer's disease: the last 22 years. *J Alzheimers Dis.* 54, 853-857, 2016.
27. Alam, Q., Alam, M.Z., Mushtaq, Damanhoury G.A., Rasool M., Kamal M.A., et al. Inflammatory process in Alzheimer's and Parkinson's diseases: central role of cytokines. *Curr Pharm Des.* 22, 541-548, 2016.
28. Chang R., Yee K.L., Sumbria R.K. Tumor necrosis factor α inhibition for Alzheimer's disease. *J Cent Nerv Syst Dis.* 9, 1179573517709278, 2017.
29. Weinreb O., Mandel S, Bar-Am O., Yogev-Falach M., Avramovich-Tirosh Y., Amit T. et al. Multifunctional neuroprotective derivatives of rasagiline as anti-Alzheimer's disease drugs. *Neurotherapeutics.* 6, 163–74, 2009.
30. Weinstock M., Luques L., Bejar C., Shoham S. Ladostigil, a novel multifunctional drug for the treatment of dementia co-morbid with depression. *Journal of Neural Transmission.* Supplementum 70, 443–6, 2006.
31. Weinreb O., Amit T., Bar-Am O., Youdim M.B. Induction of neurotrophic factors GDNF and BDNF associated with the mechanism of neurorescue action of rasagiline and ladostigil: new insights and implications for therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1122, 155–68, 2007.
32. Weinstock M., Poltyrev T., Bejar C., Youdim M.B. Effect of TV3326, a novel monoamine-oxidase cholinesterase inhibitor, in rat models of anxiety and depression. *Psychopharmacology.* 160, 318–24, 2002.
33. Weinstock M., Gorodetsky E., Poltyrev T., Gross A., Sagi Y., Youdim M. A novel cholinesterase and brain-selective monoamine oxidase inhibitor for the treatment of dementia comorbid with depression and Parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27, 555–61, 2003.
34. Reger M.A., Watson G.S., Green P.S., Baker L.D., Cholerton B., Fishel M.A, et al. Intranasal Insulin Administration Dose-Dependently Modulates Verbal Memory and Plasma Amyloid- β in Memory-Impaired Older Adults. *J Alzheimers Dis.* 13, 323–331, 2008.
35. Atri A. Current and Future Treatments in Alzheimer's Disease. *Semin Neurol.* 39, 227-240, 2019.
36. Yoshiyama Y., Lee V.M., Trojanowski J.Q. Therapeutic strategies for tau mediated neurodegeneration. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 84, 784-795, 2013.
37. Wisniewski T., Goñi F. Immunotherapeutic approaches for Alzheimer's disease. *Neuron.* 85, 1162-1176, 2015.
38. Logovinsky V., Satlin A., Lai R., Swanson C., Kaplow J., Osswald G. et al. Safety and tolerabil-

- ity of BAN2401--a clinical study in Alzheimer's disease with a protofibril selective A β antibody. *Alzheimers Res Ther.* 6, 14, 2016.
39. Schwarz A.J., Sundell K.L., Charil A., Case M.G., Jaeger R.K., Scott D et al. Magnetic resonance imaging measures of brain atrophy from the EXPEDITION3 trial in mild Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 5, 328-337, 2019.
 40. Augelli-Szafran C.E., Wei H.X., Lu D., Zhang J., Gu Y., Yang T. et al. Discovery of notch-sparing gamma-secretase inhibitors. *Curr. Alzheimer Res.* 7, 207, 2010.
 41. Burki T. Alzheimer's disease research: the future of BACE inhibitors. *Lancet.* 391, 2486, 2018.
 42. Henley D., Raghavan N., Sperling R., Aisen P., Raman R., Romano G. Preliminary results of a trial of atabecestat in preclinical Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 380, 1483-1485, 2019.
 43. Cho W.H., Park J.C., Kim D.H., Kim M.S., Lee S.Y., Park H. et al. ID1201, the ethanolic extract of the fruit of *Melia toosendan* ameliorates impairments in spatial learning and reduces levels of amyloid beta in 5XFAD mice. *Neurosci Lett.* 583, 170-175, 2014.
 44. Vellas B., Sol O., Snyder P.J., Ousset P.J., Haddad R., Maurin M. et al. EHT0202 in Alzheimer's disease: a 3-month, randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Curr Alzheimer Res.* 8, 203-212, 2011.
 45. Alzoubi K.H., Al Subeh, Z.Y., Khabour O.F. Molecular targets for the interactive effect of etazolate during post-traumatic stress disorder: role of oxidative stress, BDNF and histones. *Behav Brain Res.* 369, 111930, 2019.
 46. Reger M.A., Watson G.S., Frey W.H. 2nd, Baker L.D., Cholerton B., Keeling M.L. et al. Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: Modulation by APOE genotype. *Neurobiology of Aging* 27, 451-458, 2006.
 47. Kickstein E., Krauss S., Thornhill P., Rutschow D., Zeller R., Sharkey J. et al. Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, :21830-5, 2010.
 48. Verdile G., Fuller S.J., Martins R.N. The role of type 2 diabetes in neurodegeneration. *Neurobiology of Disease.* 84, 22-38, 2015.
 49. Schioth H.B., Craft S., Brooks S.J., Frey 2nd W.H., Benedict C. Brain insulin signaling and Alzheimer's disease: current evidence and future directions. *Molecular Neurobiology.* 46, 4-10, 2012.
 50. Maruthur N.M., Tseng E., Hutfless S., Wilson L.M., Suarez-Cuervo C., Berger Z. et al. Diabetes Medications as Monotherapy or Metformin-Based Combination Therapy for Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Intern Med.* 164, 740-51, 2016.
 51. Wheeler S., Moore K., Forsberg C.W., Riley K., Floyd J.S., Smith N.L. et al. Mortality among veterans with type 2 diabetes initiating metformin, sulfonylurea or rosiglitazone monotherapy. *Diabetologia* 56, 1934-1943, 2013.
 52. Jiang Q., Heneka M., Landreth G.E. The role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) in Alzheimer's disease: therapeutic implications. *CNS Drugs* 22, 1-14, 2008.
 53. Pancani T., Phelps J.T., Searcy J.L., Kilgore M.W., Chen K.C., Porter N.M. et al. Distinct modulation of voltage-gated and ligand-gated Ca²⁺ currents by PPAR-gamma agonists in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem.* 109, 1800-11, 2009.
 54. Gupta A., Bisht B., Dey C.S. Peripheral insulin-sensitizer drug metformin ameliorates neuronal insulin resistance and Alzheimer's-like changes. *Neuropharmacology* 60, 910-920, 2011.
 55. Kickstein E., Krauss S., Thornhill P., Rutschow D., Zeller R., Sharkey J. et al. Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 21830-5, 2010.
 56. Hotamisligil S. Inflammatory pathways and insulin action. *International Journal of Obesity.* 27, S53-S55, 2003.
 57. Veurink G., Fuller S.J., Atwood C.S., Martins R.N. Genetics, lifestyle and the roles of amyloid beta and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Ann Hum Biol.* 30, 639-67, 2003.
 58. Montaigne D., Butruille L., Staels B. PPAR control of metabolism and cardiovascular functions. *Nat Rev Cardiol.* 18, 809-823, 2021.

59. García-Casares N., García-Arnés J.A., Gómez-Huelgas R., Valdivielso-Felices P., García-Arias C., González-Santos P. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) mimetics: a new treatment for Alzheimer's disease? *Revista De Neurología* 59, 517–524, 2014.
60. Chiti F., Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem.* 75, 333–66, 2006.
61. Consolim-Colombo F.M., Sangaleti C.T., Costa F.O., Morais T.L., Lopes H.F., Motta J.M. Galantamine alleviates inflammation and insulin resistance in patients with metabolic syndrome in a randomized trial. *JCI Insight.* 2, e93340, 2017.
62. Secnik J., Schwertner E., Alvarsson M., Hammar N., Fastbom J., Winblad B. et al. Cholinesterase inhibitors in patients with diabetes mellitus and dementia: an open-cohort study of ~23 000 patients from the Swedish Dementia Registry. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 8, e000833, 2020.
63. Taylor D., Paton C., Kapur S. Prescribing Guidelines in Psychiatry. 12th ed. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, 2015.
64. Ballard C., Corbett A. Management of neuropsychiatric symptoms in people with dementia. *CNS Drugs.* 24, 729–739, 2010.
65. Seitz D.P., Andunuri N., Gill S.S., Gruneir A., Herrmann N., Rochon P. Antidepressants for agitation and psychosis in dementia. *Cochrane Database Syst Rev.* 16, CD008191, 2011.
66. Schneider L.S., Frangakis C., Drye L.T., Devanand D.P., Marano C.M., Mintzer J. et al. CitAD Research Group. Heterogeneity of treatment response to citalopram for patients with Alzheimer's disease with aggression or agitation: the CitAD randomized clinical trial. *Am J Psychiatry.* 173, 465–472, 2016.
67. Leonpacher A.K., Peters M.E., Drye L.T., Makino K.M., Newell J.A., Devanand D.P. et al; CitAD Research Group. Effects of citalopram on neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's dementia: evidence from the CitAD study. *Am J Psychiatry.* 173, 473–480, 2016.
68. Pasqualetti G., Tognini S., Calsolaro V., Polini A., Monzani F. Potential drug-drug interactions in Alzheimer patients with behavioral symptoms. *Clin Interv Aging.* 10, 1457–1466, 2015.
69. Masopust J., Malý R., Vališ M. Risk of venous thromboembolism during treatment with antipsychotic agents. *Psychiatry Clin Neurosci.* 66, 541–552, 2012.
70. Steinberg M., Lysketos C.G. Atypical antipsychotic use in patients with dementia: managing safety concerns. *Am J Psychiatry.* 169, 900–906, 2012.
71. US FDA. Public Health Advisory: deaths with antipsychotics in elderly patients with behavioral disturbances; 2005. Available from: <http://www.fda.gov/drugs/drugsafety/postmarket-drugsafetyinformationforpatientsandproviders/drugsafetyinformationforhealthcareprofessionals/publichealthadvisories/ucm053171.htm>.
72. Kales H.C., Kim H.M., Zivin K., Valenstein M., Seyfried L.S., Chiang C. et al. Risk of mortality among individual antipsychotics in patients with dementia. *Am J Psychiatry.* 169, 71–79, 2012.
73. Sarva H., Henchcliffe C. Evidence for the use of pimavanserin in the treatment of Parkinson's disease psychosis. *Ther Adv Neurol Disord.* 9, 462–473, 2016.

Application of Factorial Design to evaluate the effect of Antioxidants on the stability of N-Acetylcysteine and Acebrophylline Immediate Release Bilayer Tablets

Kumaravelrajan R.^{1*} Gokul Raj M¹, Ch. Ajay Babu², Suba V³, Grace Rathnam¹

¹Department of Pharmaceutics, C.L. Baid Metha College of Pharmacy, Thoraipakkam, Chennai-600097.

²Department of Pharmaceutics, M.A.M. College of Pharmacy, Narasaraopet, Andhra Pradesh, 522601, India

³ Department of Pharmacology, National Institute of Siddha, Chennai - 600 047, Tamil Nadu, India.

KEYWORDS:

Acebrophylline, Acetylcysteine, N, N'-Diacetyl-L-cystine, Bilayer Tablet, Antioxidant, factorial design

ARTICLE INFO:

Received: May 6, 2022

Revised: May 26, 2022

Accepted: May 30, 2022

Published on line: October 18, 2022

* CORRESPONDING AUTHOR:

Department of Pharmaceutics,
C.L. Baid Metha College of Pharmacy,
Thorapakkam, Chennai-600097 Tamil Nadu, India.
E-mail address: rkumaravelrajan@gmail.com
Tel: + 9444650763.

ABSTRACT

More than 90% of the modern formulations are to be orally ingested. This shows the popularity of this formulation type over the world thus, a majority of researchers prefer to focus on it. Bilayer tablets are the medicines which consist of two same or different drugs combined in a single dose for effective treatment of the disease. The aim of present research work was to formulate bilayer tablets of Acebrophylline (mucolytic and bronchodilator) and N-Acetylcysteine through their incorporation in an oral dosage form for immediate release. Both drugs were compressed one after the other in Bi-layer tablet machine than mixed together to form a single layer in order to reduce incompatibility and formation of N, N'-Diacetyl-L-cystine (breakdown product) from N-Acetylcysteine. While the layer of Acebrophylline was kept unaffected, a computer-aided optimization technique using 2³ (three-factor and two-level) factorial design was employed to investigate the effect of the amounts of three anti-oxidants Butylated-hydroxy toluene, Vitamin E (as concentrated), and Propyl gallate, planned as three independent process variables (factors) to the level of degradation product N, N'-Diacetyl-L-cystine which was used as dependent variable in the study. Therefore, eight trial formulations were prepared with different amounts of the independent variables and evaluated for micrometric properties and dissolution. Based on the results of the factorial design an optimised formulation was prepared complying with Pharmacopeia levels of N, N'-Diacetyl-L-cystine and evaluated for its dissolution and stability.

1. Introduction

Layer tablets are composed of two or three layers of granulation compressed together¹. This dosage form has the advantage of separating two incompatible substances with an inert barrier between them^{2,3,4}. Bilayer tablets are one of the best options for developing fixed-dose combination (FDC) formulations, with different drug dissolution behaviours for each drug in a single dosage form⁵. The bilayer tablet is gaining more attention due to its advantages over the monolithic tablet⁶. Acebrophylline is an airway mucus regulator with anti-inflammatory action and is therapeutically effective in patients with acute or chronic bronchitis, chronic obstructive or asthma-like bronchitis and recurrence of chronic bronchitis⁷. N-Acetylcysteine (Acetylcysteine) is a safe and readily available agent that modifies the synaptic release of glutamate in subcortical brain regions via modulation of the cysteine-glutamate antiporter⁸. The soluble precursor Acetylcysteine is easily converted into bioavailable cysteine. However, it is oxidised to its dimer N, N'-Diacetyl-L-cystine (DAC), which is almost unconvertable to cysteine when given intravenously resulting in a diminished bioavailability of cysteine^{9,10}. Toxicity or Safety of DAC has not been proven^{11,12}. The stability of Acetylcysteine can be improved by antioxidants¹³.

Given the specific end goal of maintaining product quality, the Quality by Design (QbD) approach has become mandatory for all regulatory agencies. The principle of QbD is described in the Q8 (R2) guideline of the International Conference on Harmonisation (ICH). The ICH guidelines that include scope, definition, and high-level guidance of QbD in the pharmaceutical area¹⁴⁻¹⁵. The important elements of QbD include defining the objective, i.e. Quality Target Product Profile (QTPP), determination of critical quality attributes (CQAs), risk assessment, development of experimental design, implementation of the control strategy, and continuous improvement¹⁶. In addition, QbD protocol should be confirmed after the design of experiment (DOE)^{17,18,19}. Two-level, three variable full factorial design has been reported to be suitable for such studies.²⁰

Synthetic phenolic antioxidants (butylated butylated hydroxytoluene [BHT], propyl gallate and natural Vitamin E can be used as anti-oxidants²¹. The aim of present research work was undertaken to formulate bilayer tablets of Acebrophylline (mucolytic and bronchodilator) and N-Acetylcysteine through its incorporation of an oral dosage form that is able to release immediately. 2³ (three-factor and two-level) factorial design was employed to investigate the effect of the amounts of three anti-oxidants, namely of Butylated-hydroxy toluene, Vitamin E (as concentrated) and Propyl gallate, planned as three independent process variables (factors) and level of DAC used as dependent variable in the study.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Acebrophylline was purchased from Kores India Ltd, and Acetylcysteine was purchased from Wuhan Grand Hoyo, China. Microcrystalline Cellulose and β -Cyclodextrin bought from DFE Pharma Ltd, Cuddalore and Gangwal Chemical Ltd, Mumbai. Vitamin E concentrated Pdt, Butylated Hydroxy Toluene and Propyl Gallate were obtained from Dsm Nutritional PdtLtd, Switzerland, Finer Ltd, Mumbai, and PanReac Applichem Ltd, India. Other chemicals and solvents used were analytical grade.

2.2 Methods

2.2. 1 Drug-Polymer compatibility study

Drug-drug and drug-polymer compatibility were studied utilizing FTIR spectroscopy (Electrolab India Pvt Ltd)^{22,23,24}. The FTIR spectra have been recorded for single and combination medications with polymers, using the Potassium Bromide (KBr) method. The drug and combination samples have been added to KBr (1:1) and recorded within the range 500 to 3500 cm⁻¹ in 4 cm⁻¹ resolution.

2.2.2 Risk Assessment

This goal must be identified in the initial stages of

product development^{5,15}. The QTPP contains the quality details of the item's product attributes to ensure that the item meets the essential requirements. The QTPP and CQA of the bilayer tablet currently studied reduced the level of NN DA to an acceptable level that could be achieved with antioxidants.

2.2.3 Design of Experiment (DOE)

In the present work 8-run, 3 factor, 2-level full-factorial design was used for creating second order polynomial models²⁵ and analysing quadratic response surfaces for optimizing the immediate release layers of core tablets using Design-Expert software (Trial version 11.0.5.0, Stat-Ease Inc., MN)^{26,27,28}. This design is used to assess the main, interaction, and quadratic effects of the independent variable on the dependent variable. The factors evaluated in the present work are concentrations of three antioxidants as BHT (mg), Propyl gallate (mg), and Vitamin E (mg) at low, medium, and high values for the immediate release layer of Acetylcysteine with no change in any of the component in Acebrophylline immediate release layer. The dependent variable/response is the DAC of the immediate release layer. The variables and their levels used in the development and optimization of the immediate-release tablet layer are shown in **Table 1**.

2.2.4 Preparation of immediate release layer of Acebrophylline

Acebrophylline was sifted individually by using #20 mesh. Microcrystalline cellulose, lactose monohydrate were sieved using a #30 mesh sieve. Povidone k30 was dissolved in isopropyl alcohol. Quinoline yellow supra was added and transferred to the sifted materials and binder solution to Granulation area. The sifted material loaded into the main bowl of the Saizoner Mixer Granulator (Daiichi Jitsugyo America, Inc), slowly added to the binder solution and mixed for 15 min. The wet pellets were transferred in a tray dryer at 50°C. The wet granules were first air-dried for 20 min, then continued to dry for 1 hour and 20 min at 50°C. The Semi-Dried granules passed through mesh 16# and milled

the retained granules through Multi-Mill fitted with 1.0 mm screen using knives forward medium speed. The semi-dried and ground granules were sieved into a tray dryer and dried for infrared determination of moisture content at 105°C. If the moisture content found more than the limit, drying was continued until the desired moisture content achieved (Limit:2-4%). Finally, dried granules passed through #16 mesh and sifted. The following materials' cross povidone, colloidal silicon dioxide, talc were sifted individually by using #40 mesh. The dried granules and sifted extra granular materials were loaded into Octagonal blender and blended for 15min at 10 rpm. Magnesium stearate was dispensed and sifted by using # 60 mesh to the above blend and mixed for 5 min at 10 rpm.

2.2.5 Preparation of immediate release layer of Acetylcysteine

Screening weighed acetyl cysteine, β-cyclodextrin, colloidal silica, talc, butyl hydroxytoluene, propyl gallate, vitamin E concentrated powder were sifted and let pass through Mesh #30. Quantities for its preparation are presented in **Table 2** Povidone k30 dissolved in isopropyl alcohol and labelled as a binder. Semi shifted material was loaded in into Saizoner Mixer Granulator, and mixed for 15 mins. Binder solution was slowly added into saizoner mixer granulator. All wet pellets were transferred in a tray dryer at 50°C (Tapasaya Engineering Work Pvt Ltd). At first, the wet granules were air dried for 10 min. After that, drying was continued at 50°C for 1 hour and 30 min. The semi-dried granules were passed through a 16# sieve, and the retained granules were ground through a Multi-Mill fitted with a 1.0 mm sieve using a knife to grind forward at medium speed (Sams Techno Mech Pvt.Ltd,India). The semi-dried sifted and milled granules were transferred into tray drier and dried with Infra-Red Moisture balance (Ratwag Balances, Poland) determining the moisture content at 50°C. If it is found more than the limit the drying continues until the desired moisture content is achieved (Limit: 1-2%). Finally, the dried granules were passed through a #16 mesh. The following materials such as crospovidone, colloidal

Table1:Design Matrix with level and variables for 2³ factorial

| Code | Factor A (Vitamin E) | Factor B (BHT) | Factor C (Propyl gallate) |
|--------|-------------------------|-------------------|------------------------------|
| (1) | - | - | - |
| A | + | - | - |
| B | - | + | - |
| Ab | + | + | - |
| C | - | - | + |
| Ac | + | - | + |
| Bc | - | + | + |
| Abc | + | + | + |
| Factor | Level | Symbol | Assigned value |
| A | Low | - | 0.1 mg |
| A | High | + | 0.4 mg |
| B | Low | - | 0.4 mg |
| B | High | + | 0.8 mg |
| C | Low | - | 0.4 mg |
| C | High | + | 0.8 mg |

silicon dioxide, talc, banana, powerome strawberry, ethyl vanillin, mixed fruit powder were sifted using a #40 mesh sieve. Intra-granular and extra-granular materials were loaded into Octagonal blender (Sams Techno Mech Pvt.Ltd, India) and blended for 15min at 10 rpm. Magnesium stearate was sifted by using # 60 mesh, dispersed in the above the blend and mixed for 5 min at 10 rpm.

2.2.6 Micrometric evaluation

The Bulk and Tap density determined by Tap density tester (Electrolab India Pvt Ltd). The powder

sample was carefully poured into a graduated cylinder (50 mL)^{5,29,30}. The apparent volume (V_0) and the mass of the powder sample were recorded. Bulk density (BD, g/mL) is calculated as the mass divided by the volume of unconsolidated powder in the graduated cylinder. After the experiment for BD, the graduated cylinder was placed in a tapped density tester. The powder was tapped 500 times and the tap volume was measured, as all samples showed no significant volume change after 500 taps. Tapped density (TD, g/mL) was calculated as the weight divided by the volume of tapped powder in a graduated cylinder. Measured in triplicate and

Table2. Composition of powder blend for development of immediate-release acebrophylline and acetyl cysteine immediate release bilayer tablets

| Ingredients | F-1 (mg/tab) | F-2 (mg/tab) | F-3 (mg/tab) | F-4 (mg/tab) | F-5 (mg/tab) | F-6 (mg/tab) | F-7 (mg/tab) | F-8 (mg/tab) |
|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Acebrophylline | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| Lactose Monohydrate | 138.50 | 135.00 | 131.50 | 124.00 | 124.00 | 124.00 | 124.00 | 124.00 |
| Microcrystalline Cellulose 101 | 47.80 | 47.80 | 47.80 | 47.80 | 47.80 | 47.80 | 47.80 | 47.80 |
| povidone k30 | 3.00 | 4.50 | 6.00 | 9.00 | 9.00 | 9.00 | 9.00 | 9.00 |
| Quinoline yellow supra | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| Methylene di chloride | 50.00 | 50.00 | 50.00 | 50.00 | 50.00 | 50.00 | 50.00 | 50.00 |
| Isopropyl Alcohol | 40.00 | 40.00 | 40.00 | 40.00 | 40.00 | 40.00 | 40.00 | 40.00 |
| Crospovidone | 3.00 | 4.50 | 6.00 | 9.00 | 9.00 | 9.00 | 9.00 | 9.00 |
| Colloidal silicon dioxide | 1.50 | 1.50 | 2.00 | 2.50 | 2.50 | 2.50 | 2.50 | 2.50 |
| Talc | 4.00 | 4.50 | 4.50 | 4.50 | 4.50 | 4.50 | 4.50 | 4.50 |
| Magnesium Stearate | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 |
| N Acetylcysteine | 600.00 | 600.00 | 600.00 | 600.00 | 600.00 | 600.00 | 600.00 | 600.00 |
| β-cyclodextrin | 52.90 | 52.20 | 52.70 | 41.80 | 49.10 | 48.80 | 49.10 | 48.80 |
| colloidal silicon dioxide | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 |
| vitamin E concentrated pdt * ¹ | 0.10 | 0.40 | 0.10 | 0.40 | 0.10 | 0.40 | 0.10 | 0.40 |
| Butylated Hydroxyl Toluene * ² | 0.40 | 0.40 | 0.80 | 0.80 | 0.40 | 0.40 | 0.80 | 0.80 |
| Propyl Gallate * ³ | 0.40 | 0.40 | 0.40 | 0.40 | 0.80 | 0.80 | 0.80 | 0.80 |
| Povidone k30 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 |
| MDC | 30.00 | 30.00 | 30.00 | 30.00 | 30.00 | 30.00 | 30.00 | 30.00 |
| Isopropyl alcohol | 70.00 | 70.00 | 70.00 | 70.00 | 70.00 | 70.00 | 70.00 | 70.00 |

| | | | | | | | | |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Crospovidone | 15.00 | 15.00 | 15.00 | 15.00 | 16.00 | 16.00 | 16.00 | 16.00 |
| Collidal silicon dioxide | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 |
| Talc | 6.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 | 6.00 |
| Magnesium Stearate | 10.00 | 10.00 | 10.00 | 10.00 | 12.00 | 12.00 | 12.00 | 12.00 |
| Total* | 1060 | 1060 | 1060 | 1060 | 1100 | 1100 | 1100 | 1100 |

*Quantity of flavours not shown in table, *1,2,3 indicated level of antioxidant in Acetylcysteine layer

in compliance with USP bulk density and powder tap density. Compressibility index (Carr's index) of the dry powder blends for immediate release tablet layers was calculated by $CI=100[(\rho_T-\rho_B)/\rho_B]$ where, (ρ_T) is the true density and ρ_B is the bulk density. Hausner's, ratio of dry powder blends for immediate tablet layers was determined by the following formula: Hausner's ratio= TD/BD. Values less than 1.25 indicate good liquidity, while values greater than 1.25 indicate poor liquidity. Values between 1.25 and 1.5 are considered as average flow, and generally, a glidant has to be added for improving the flow properties.

2.2.7 Compression of Bilayer Tablets

Acebrophylline and Acetylcysteine layers were prepared according to the formula as shown in **Table 2**. The granule volume of the immediate release layer was lightly compressed using a 10-station compression (Karnavathi Engineering Ltd) using a 19.5 x 9.5mm caplet shape punch with a break line on one side and a flat on the other side. Over this compressed layer, required quantity of the second immediate release layer was placed and compressed to obtain hardness in the range of 5-8 kg/cm² to form a bilayer tablet of immediate release of Acebrophylline and Acetylcysteine. Then the compressed Bilayer tablets were evaluated.

2.2.8 Film Coating of bilayer tablet

Isopropyl alcohol was transferred into a clean stainless steel vessel. HPMC based film coating material (DRCOAT- FLV) was added to isopropyl alcohol. Next, Opadry white was added and was passed through the colloidal mill and mixed with the above solution. Finally, methylene chloride was added to the above solution with continuous stirring. Care was taken that there were no lumps formation in the solution visually. The above solution was filtered through mesh 100# nylon cloth. The above solution was transferred into a SS vessel of pressure fitted with stirrer. Coating process carried out by film coating equipment (Pharma R&D Coater, Ideal Cure Pvt.Ltd).

2.2.9 Evaluation of Bilayer Tablets

Bilayer tablets were evaluated according to standard procedures of the Indian Pharmacopoeia. Friability (Electrolab Pvt Ltd, India), Weight variation, Content uniformity and Disintegration time were also determined ((Mettler-Toledo India Private Limited)³¹.

2.3 In vitro dissolution

Dissolution tests of the prepared bilayer tablets were conducted using the USP paddle method (Dissolution Apparatus, Tdt-081, Electrolab). The drug

Table3. Evaluation of bilayer tablet

| Batch | Thickness (mm) | Hardness (K/cm ²) | Friability (%) | Weight variation (mg ±SD) | Disintegration Time (s) |
|-------|-------------------|-----------------------------------|-------------------|---------------------------------|----------------------------|
| F1 | 5.48-5.58 | 8.60-9.80 | 0.37 | 1060 ± 2.02 | 345 |
| F2 | 5.5-5.62 | 8.50-9.60 | 0.36 | 1060 ± 1.04 | 256 |
| F3 | 5.52-5.55 | 9.40-9.90 | 0.37 | 1060 ± 2.2 | 243 |
| F4 | 5.60-5.67 | 9.45-10.72 | 0.32 | 1060 ± 2.24 | 281 |
| F5 | 5.82-5.85 | 11.65-12.33 | 0.21 | 1100 ± 1.02 | 307 |
| F6 | 5.83-5.85 | 11.20-12.01 | 0.22 | 1100 ± 2.13 | 312 |
| F7 | 5.83-5.88 | 11.00-11.32 | 0.24 | 1100 ± 2.26 | 323 |
| F8 | 5.85-5.92 | 11.17-11.36 | 0.25 | 1100 ± 2.36 | 333 |
| F9* | 5.55-5.60 | 9.45-9.90 | 0.12 | 1100 ± 2.48 | 241 |

* Optimized batch (F9)

dissolution medium consisted of 1000 ml of buffer (pH 1.2, 100 rpm, 37 ± 0.5 °C). The number of experiments for each sample was six. Five-millilitre aliquots were collected from the dissolution medium at predetermined time points. The drug concentration was determined by HPLC-UV method. Chromatographic conditions: Instrument Shimadzu, HPLC equipped with UV detector, Column: Agilent Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 μ) or equivalent. Column Temperature, 30° C and Flow rate: 1.0 ml/min, Wavelength 225 nm for Acetylcysteine and 248 nm for Acebrophylline, Injection volume was 10 μ l, Run time: 15 min., Pump mode: Gradient. HPLC method developed for simultaneous estimation of Acebrophylline and Acetylcysteine Briefly, buffer solution preparation, standards, check standard solutions were prepared for mobile phases A and

B. The percentage of Relative standard deviation (RSD), the tailing factor, and the theoretical plate count were used to find out system suitability. The gradient programme (Gradient elution in HPLC refers to the technique of altering the composition of the mobile phase during the course of the chromatographic run.) for dissolution was run up to 15 min for mobile phase A and mobile phase B and optimized at 5 min with 65 % (mobile phase A) and 35 % (mobile phase B).

2.4 Determination N, N'-Diacetyl-L-cystine (DAC)

The drug concentration was obtained by HPLC-UV method after filtration of the sample solution with a syringe filter, as described above. Column specification was 250x 4.6 mm, 5 μ l; Inertsil ODS-3V or

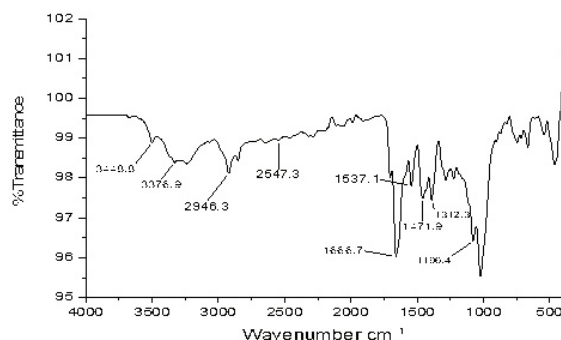


Figure 1. FTIR Spectra of Acebrophylline and Acetylcysteine bilayer tablets

equivalent. Column Temperature 30°C with a Flow rate 1.0 ml/min and Wavelength 225 nm for Acetylcysteine & 248 nm for Acebrophylline. Injection volume 20 µl, Run time; 50 min. Pump mode; Gradient.

3. Results and Discussion

3.3.1 FT-IR

The FT-IR spectrum of Acebrophylline was obtained. The characteristic absorption of the Acebrophylline was the band at 3448.7 cm⁻¹, which is assigned to the functional group O-H Stretching and 2944.2 cm⁻¹ assigned to the functional group C-H Stretching³². Another band at 1666.5 cm⁻¹ is due to COOH Stretching. Another band at 1473.6 cm⁻¹ is due to CH₂ Bending. Similarly, the FTIR spectra for the characteristic absorption of Acetylcysteine was the band at 2546.0 cm⁻¹, which was assigned to the SH Stretching vibration. The 3379.2 cm⁻¹ band is assigned to the N-H and the band at 1535.3 cm⁻¹ is assigned to the C-N Stretching. The characteristic absorption bands at 1195.8 cm⁻¹, is assigned to the N-H stretching vibration³³. The peaks of the various functional groups as described in the individual IR spectra of Acebrophylline and Acetylcysteine were also present in the Acebrophylline with Acetylcysteine Tablet (**Figure 1**) without any shift or change. These observations revealed the intact na-

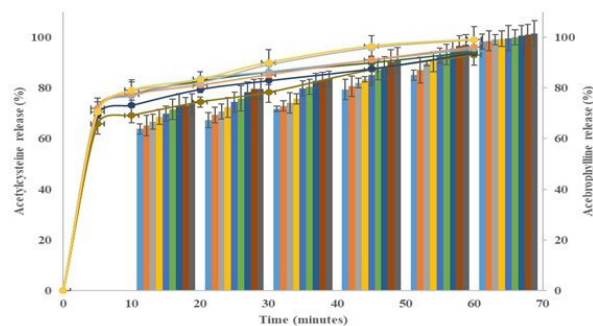
ture of the Acebrophylline and Acetylcysteine present in the tablet. From these results, the absence of drug-drug interaction and the stability of the drug in the tablet were confirmed.

3.3.2 Identification of critical quality attributes (CQAs)

Definition of critical quality attributes (CQAs) for bilayer tablets have already been reported by Singh *et al*¹⁵. The CQAs of the drug product are determined from the QTPP analysis for use in the initial Risk Assessment (RA), provided that the CQAs must meet predefined requirements to ensure the expected quality of the drug product^{5,15}. The identified subsets of CQAs were appearance, friability, hardness, content, content uniformity, dissolution, degradation products, residual solvents, and microbial limits by initial RA. These CQAs have the potential to be altered by the formulation variables and process steps of bilayer tablet manufacturing. Principle degradation product of Acetyl cysteine, N, N'-Diacetyl-L-cystine level considered as CQA in the present investigation.

3.3.3 Micrometric evaluation

The granules prepared for Bilayer tablets were physically evaluated and it was suggested to be suitable for compression into tablets. The flow properties of powder blend Acebrophylline and Acetylcysteine were checked by studying the bulk density, tapped density, compressibility Index, and Hausner's ratio. The powder blends were found to be free flowing with good flow properties and bulk densities were found to be in the range of 0.625–0.735. (g/ml) and tapped density between 0.842 and 0.902 (g/ml) for all the formulations. The % of compressibility index calculated using the density data. The obtained values 17.04–19.6 % that was found to be good flow and Hausner's ratio values were in the range of 1.205–1.245 for all powder blends. The results confirmed that both granules had acceptable levels of physical properties suitable for use in the tableting process^{34,35}.



$n=3$

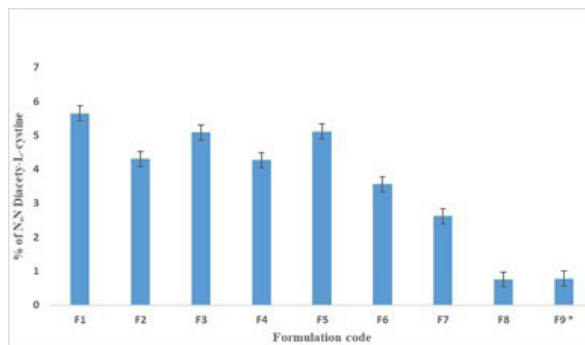
Figure 2. *In vitro* dissolution profile* of Acebrophylline (Bar in secondary axis) and Acetylcysteine (line in primary axis) with optimized formulation (F9)

3.3.4 Hardness, Friability, Drug content and Drug Release

Characterization of prepared bilayer tablets shown in **Table 3**. Bilayer tablets prepared from all batches F1-F8 demonstrated that they had an acceptably smooth surface with no layer separation from either side and were within the bilayer process parameters used in the study. The hardness of the bilayer tablets for the different experimental runs ranged from 11.17 - 11.36 & 11.2 - 11.38 kg/cm². The results show that as the compressive pressure increases, the friability decreases with increasing hardness³⁶.

3.3.5 Drug Content and in vitro dissolution release

The Acetylcysteine content was determined to be 98.46-101.55 % and 97.4-101.9 %, respectively. The speed of the bilayer compression machine is not adjusted during this process as it is fixed at 25 rpm. Both granulation process and speed of the equipment contribute equally to content uniformity of tablets. Hence, it was suggested that a lower turret speed can result in better uniformity³⁵. The *in vitro* dissolution profile is shown in **Figure 2** (XYZ, 3D Graph). The dissolution of the Acetylcysteine layer was found to be satisfactory, releasing 65% at 5 min and 100% at 60 minutes. All 8



*Optimized formulation

Figure 3. The percentage of degradant with all formulations containing various level of antioxidants (F1-F8).

batches of dissolution testing were conducted with only 60 minutes. Despite maximising the quantity of β -cyclodextrin, the efficiency of drug release for batch F1 to F4 did not increase. From batch F4-F8 burst release was obtained in this layer after 5 min, 80 % released at 30 min and complete release achieved at 60 min. Although the total tablet weight was reduced from 800 mg to 760 mg, drug release was observed to be little lower (65-71% at 5 min and 85-90% at 30 minutes) for batches F1-F4, but the dissolution profiles for F5 to F8 were observed to be 72 % at 5 min and 90% in 30 minutes. All batches shown 95% of drug release at 45 minutes. These results shows that all bilayer tablets used in the DOE dissolve almost completely and thus meet the dissolution criteria for 80% drug release was confirm that acetyl cysteine dissolution from all the investigated runs in DOE conformed with the target profiles. Similar behaviour was obtained with the Acebrophylline layer where drug release was found from 63% to 100% within 60 min. Comparatively, dissolution profile of drug from F1-F3 was slightly lower than from F4-F8. For all batches, weight of layer maintained constant of 300 mg. Moreover, increasing content of lactose did not increase drug release appreciably. It was also observed that drug release from one layer depends on the properties or release behaviour of the other layer in bilayer tablet technology.

3.3.6 Effect of antioxidants on N, N'-Diacetyl-L-cystine (DAC)

The percentages of the related substance and principle degradation product of Acetylcysteine DAC are illustrated in **Figure 3**. The DAC was found to be 5.65% for F1 which marked higher than the Pharmacopoeia limit (less than 1%) and higher in all other batches and more due to lower level of Vitamin E in this batch. High percentage 5.12 % of the substance was found in F5 where propyl gallate was used at higher level (0.8mg/tablet). N, N'-Diacetyl-L-cystine was decreased to 4.31% and 4.27% for F2 and F4. 0.8 mg of BHT or 0.4 mg of propyl gallate and 0.1 mg of Vitamin E reduced the (DAC satisfactorily (5.09%). Converse, in F3 and F6 formulation containing high levels of anti-oxidant of propyl gallate and BHT the degradation of Acetylcysteine was reduced to 5.09 % and 3.62 % respectively. Thereby, increasing the concentration of antioxidants, relative substance was further reduced. When BHT and propyl gallate was used at high level (0.80 mg/tablet), percentage of DAC was markedly reduced to 2.62 % for F7. The best formulation with 0.76 % of related substance was obtained with F8 when all the three critical variables of anti-oxidants are used at high level.

3.3.7 ANOVA & Optimization

The model generated for DAC levels was found to be significant as indicated by an F-value of 78.99 and a p-value of 0.0125 ($p < 0.05$). There was a reasonable agreement between the predicted R^2 Pred value of 0.9824 and adjusted R^2 Adj value of 0.9194 as the difference between the two was less than 0.2. (0.063) with precision of 25.48. For optimization, the effects of various independent variables on the measured responses were modelled using the following mathematical model equations involving the independent variables whose interactions on the various measured responses resulting from the 2^3 -factor design are as follows: $Y = + 3.94500 - 0.001500 A + 0.005125 B + 0.005587 C - 5.2500 AC - 0.000015 BC$ Design-Expert software explored the desirability function to obtain an optimized formu-

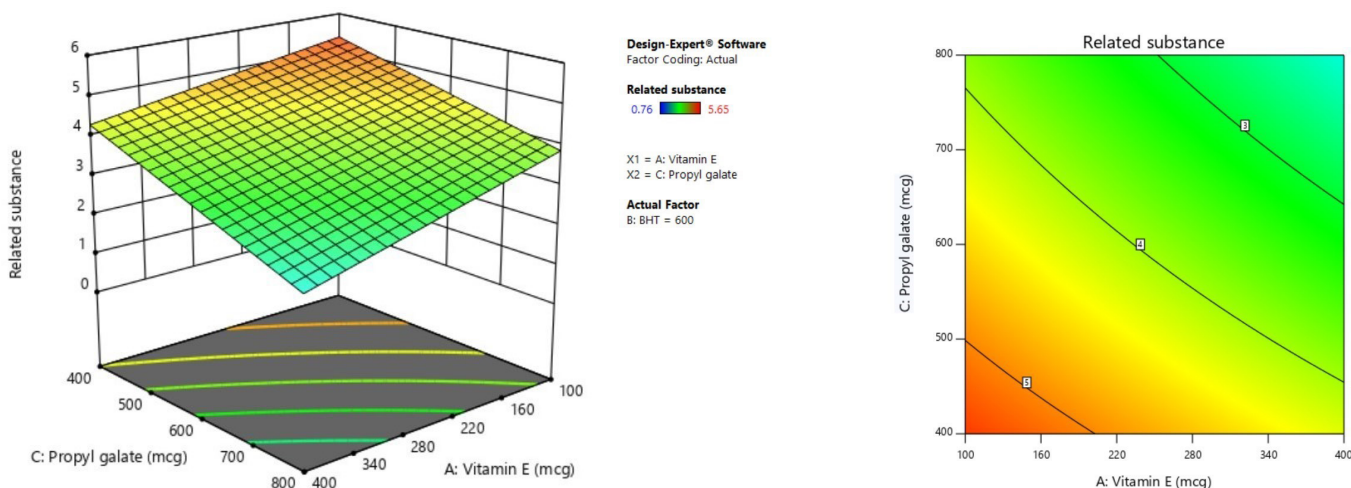
lation, which was achieved using the set example of maximum drug release and minimum disintegration time. Hence, an additional batch (F9) of bilayer tablets was prepared for validation. The composition, point prediction (optimization) and confirmation of the experimental value lie within the limit. Response surface and contour plot of the immediate-release bilayer design showing a value of 0.398.51 for vitamin E mg, BHT to be 0.800 mg, and Propyl gallate also to be 0.800 mg. The predicted value from the plot was 0.84 %, the observed value is 0.78 %, and the desirability is 0.662. The mean values of the related substances (DAC) for the optimised formulation F9 were found to be within the set limits. The layer was thus confirmed to be optimized^{37,38,39}.

3.3.8 RSM and Contour plot.

Response surface methodology (RSM) and contour plot shown in **Figure 4 (a)** and **4 (b)**. The RSM further elucidates the effect of the main influences (factors) on the investigated responses (in this case related substances). Surface plots illustrate that increased concentrations of vitamin E and propyl gallate lead to decreased related substances. Likewise, increased concentrations of BHT and propyl gallate lead to decreased related substances. The effect of antioxidants was inversely proportional to the related substances of Acetyl cysteine^{5,15,40}.

3.3.9 Kinetics

Dissolution data of the optimized formulation was fitted to various mathematical models (Higuchi and First order) in order to describe the kinetics of the drug release profile. The plot of cumulative percentage drug release as a function of time. The Korsmeyer-Peppas model ($F = (Mt/M) = K_m \cdot t^n$ where, F-fraction of drug released at time t; Mt-the mass of drug released at time t; M-the total mass of drug in dosage form; K_m -kinetic constant; n -diffusion or release exponent; t-time in hours. was used to further analyse the drug release data for curve fitting⁴¹. Peppas used this n value in order to characterise different release mechanisms,



(a)* (b) **

*(a) Response surface (3D) showing the effect of different combinations of A (Vitamin E and BHT) on desirability. **(b) contour plot showing percentage of related substance as response variable with different combination of (A) and (C). The contour line represents percent of related substance decrease with antioxidant level.

Figure 4 Response surface method showing Effect of antioxidants on related substance (N,N'-Diacetyl-L-cystine) presented by response surface plot for desirability

concluding for values for a slab, of $n=0.5$ for Fick diffusion. Therefore, the optimized formulation followed fickian diffusion kinetics, with the results ($n=0.132$) and R^2 of 0.9932^{42,43,44}.

3.4 Stability study

Accelerated Stability study carried out for optimized formulation (Newstronic, Mumbai, India). The stability study results showed that the hardness, assay content, and dissolution of the optimized bilayer tablet (F9) satisfied with the criteria for the corresponding ranges of during storage for 3 months under accelerated conditions Optimized F8 formulation was sealed in Alu-Alu Blister packaging laminated with polyamide. Sample were kept at 40°C and 75% RH for 1, 2, 3 months. At the end of the study period, the formulation was observed for change in physical appearance, color, drug content and drug release characteristics. No change in average weight of tablet (1100 ± 5 mg). Thickness and disintegration time found to be 6.55 ± 0.014 minutes. Similarly,

assay value of acebrophylline and acetyl cysteine found to be 99.28 %. Dissolution of also found to be remain intact (100.03 % of acebrophylline and 98.04 % of acetyl cysteine at 60 minutes). N, N'-Diacetyl-L-cystine, principle degradation product level did not increase from 0.76% during the stability study^{5,15,45}.

4. Conclusions

The aim of this study was to use the QbD method to investigate the effect of variables on bilayer tablet. The QTPP of the bilayer, immediate release tablet was developed as a solution of Acebrophylline and Acetylcysteine combination for the successful treatment and relief of asthma, which is almost all the problem for the pharmaceutical industry especially in stability aspects. The formulations (F1-F9) showed an acceptable range and complied with the internal specification for weight variation, thickness, hardness, friability, *in vitro* drug release. The drug content of Acebrophylline and Acetylcysteine in tab-

lets were constant while major degradation of Acetylcysteine to N, N'-Diacetyl-L-cystine was greatly reduced by introducing the antioxidants Propylgalate, vitamin E, and Bishydroxy Toluene (BHT). Using the three antioxidants as variables for a 2³-factor experimental design optimised formulation F9 prepared with a reduced level of N, N'-Diacetyl-L-cystine complying with Pharmacopeia limit (0.78). The optimized batch F9 complies with standard such as content uniformity, hardness, and friability found to be satisfactory. The content of major degradants also did not increase, meeting the pharmacopoeia standards. Accelerated stability profile of bilayer tablets was found to be satisfactory. No signs of degradation

were observed in HPLC analysis.

In conclusion, the bilayer tablet technology and factorial design could be successfully applied to the Acetylcysteine and Acebrophylline immediate release bilayer tablet dosage form. □

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest regarding this investigation.

Acknowledgments

The authors would like to thank Apex Laboratories Pvt Ltd, Chennai-32 for their kind support to carried out entire project.

References

1. Gunsell WC. (1989) *Pharmaceutical dosage forms: tablets*. Lieberman AH, editor. New York: Decker. p.p 219-287.
2. Shiyani B, Gattani S, Surana S. Formulation and evaluation of bi-layer tablet of metoclopramide hydrochloride and ibuprofen. *AAPS PharmSciTech*. 9(3),818-27, 2008.
3. Dhiman N, Awasthi R, Jindal S, Khatri S, Dua K. Development of Bilayer Tablets with Modified Release of Selected Incompatible Drugs. *Polim Med*. 46(1),5-15, 2016.
4. Chauhan M, Suthar S, Shah A, Polara M, Patel M, Bilayer tablet: Immediate Release and Sustain Release: A Review Patel J. *Research J. Pharm. and Tech*. 5(6),716-20. 2012.
5. Won DH, Park H, Ha E-S, Kim H-H, Jang SW, Kim M-S. Optimization of bilayer tablet manufacturing process for fixed dose combination of sustained release high- dose drug and immediate release low-dose drug based on quality by design (QbD). *Int J Pharm*. 605,120838. 2021.
6. Chang S-Y, Sun CC. Interfacial bonding in formulated bilayer tablets. *Eur J Pharm Biopharm*, 147, 69-75. 2020.
7. Pozzi, E. Acebrophylline: an airway mucoregulator and anti-inflammatory agent. *Monaldi Archives for Chest Disease*, 67(2),211-21. 2016.
8. di Michele F, Siracusano A, Talamo A, Niolu C. N-Acetyl Cysteine and Vitamin D Supplementation in Treatment Resistant Obsessive-compulsive Disorder Patients: A General Review. *Curr Pharm Des*. 24(17),1832-838, 2018.
9. Sommer I, Schwebel H, Adamo V, Bonnabry P, Bouchoud L, Sadeghipour F. Stability of N-Acetylcysteine (NAC) in Standardized Pediatric Parenteral Nutrition and Evaluation of N, N-Diacetylcystine (DAC) Formation. *Nutrients*. 21,12(6),1849. 2020.
10. Böhler S, Neuhäuser-Berthold M, Wagner K, Virmani K, Bässler KH. Cysteine in parenteral nutrition: comparative study of N-acetyl-cysteine and N, N-diacetylcystine in the rat model. *Infusions therapie*. 15(2), 89-92. 1988.
11. Pettersson K, Bergstrand H. The antiatherogenic effect of DiNAC: experimental findings supporting immunomodulation as a new treatment for atherosclerosis related diseases. *Cardio vasc Drug Rev*. Summer,21(2),119-32. 2003.
12. Särnstrand B, Jansson AH, Matuseviciene G, Scheynius A, Pierrou S, Bergstrand H. N, N'-Diacetyl-L-cystine-the disulfide dimer of N-acetylcysteine-is a potent modulator of contact sensitivity/delayed type hypersensitivity reactions in rodents. *J Pharmacol Exp Ther*. 288,(3),1174-84. 1999.
13. Wiel C, Le Gal K, Ibrahim MX, Jahangir CA,

- Kashif M, Yao H, et al., Stabilization by Anti-oxidants Stimulates Lung Cancer Metastasis. *Cell*. 11,178(2),330-45, 2019.
14. Guideline, I.C.H., 2009. Pharmaceutical development. Q8 (R2) Current Step 4. https://database.ich.org › files › Q8_R2_Guideline.
 15. Singh B, Saini G, Vyas M, Verma S, Thakur S. Optimized chronomodulated dual release bilayer tablets of fexofenadine and montelukast: quality by design, development, and in vitro evaluation. *Futur J Pharm Sci* . 5,1, 112-31,2019.
 16. Beg S, Hasnain MS, Rahman M, Swain S (2019). *Introduction to Quality by Design (QbD): Fundamentals, Principles, and Applications. Pharmaceutical Quality by Design. Elsevier*; p.p.134-142.
 17. Nadpara NP, Thumar RV, Kalola VN, Patel PB. Quality by design (QbD): A complete review. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 17,20-28,2012,
 18. Lawrence XY, Amidon G, Khan MA, Hoag SW, Polli J, Raju G, et al. Understanding pharmaceutical quality by design. *The AAPS journal*. 16,771-83, 2014.
 19. Kumaravelrajan R, Mohan Raj V, Thirumaran M, Suba V. Application of Factorial Design in the Premixing Operation of Diltiazem Timed-Release Pellets. *Indian J Pharm Sci*. 84(2),390-99, 2022.
 20. Massart DL, Vandeginste BGM, Buydens LMC, Jong S, Lewi PJ, Smeyers-Verbeke J. (1998) Chapter 22 *Two-level factorial designs*. Data Handling in Science and Technology, Elsevier. 20, p.p 659-682.
 21. Brewer MS. Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 10,4,221-47, 2011.
 22. Ceresole R, Han YK, Rosasco MA, Orelli LR, Segall A. Drug-excipient compatibility studies in binary mixtures of avobenzone. *J Cosmet Sci*. 64,5,317-28. 2013.
 23. Verma RK, Garg S. Selection of excipients for extended release formulations of glipizide through drug-excipient compatibility testing. *J Pharm Biomed Anal*. 15,38,633-44, 2005.
 24. Pani NR, Nath LK, Acharya S. Compatibility studies of nateglinide with excipients in immediate release tablets. *Acta Pharm*. 61,2,237-47,2011.
 25. Kumaravelrajan R, Narayanan N, Suba V, Bhaskar K. Simultaneous delivery of Nifedipine and Metoprolol tartarate using sandwiched osmotic pump tablet system. *Int J Pharm*. 399,1,60-70,2010.
 26. Dey S, Mahanti B, Khila S, Mazumder B, Gupta SD. Formulation development and optimization of bilayer tablets of aceclofenac. *Expert Opin Drug Deliv*. 9,9,1041- 50. 2012.
 27. Gattani SG, Khabiya SS, Amrutkar JR, Kushare SS. Formulation and evaluation of bilayer tablets of metoclopramide hydrochloride and diclofenac sodium. *PDA J Pharm Sci Technol*. 66,2,151-60,2012.
 28. Chun MH, Kim JY, Park ES, Choi DH. Development of a Robust Control Strategy for Fixed-Dose Combination Bilayer Tablets with Integrated Quality by Design, Statistical, and Process Analytical Technology Approach. *Pharmaceutics*. 10,13,1443- 49,2021.
 29. Van Nguyen H, Nguyen VH, Lee BJ. Dual release and molecular mechanism of bilayered aceclofenac tablet using polymer mixture. *Int J Pharm*. 30,515,233-44, 2016.
 30. Okunlola A. Design of bilayer tablets using modified Dioscorea starches as novel excipients for immediate and sustained release of aceclofenac sodium. *Front Pharmacol*. 12, 5,294,2015.
 31. Pharmacopoeia Commission Indian. Indian Pharmacopoeia (2010 3-Volume Set). 6th ed. Indian Pharmacopoeia Commission.
 32. Tapadar SR, Das M, Chaudhuri AD, Basak S, Mahapatra AB. The Effect of Acebrophylline vs Sustained Release Theophylline in Patients of COPD- A Comparative Study. *J Clin Diagn Res*. 8,9,11-4,2014.
 33. Kerc J, Srcic S, Urleb U, Kanalec A, Kofler B, Smid-Korbar J. Compatibility study between acetylcysteine and some commonly used tablet excipients. *J Pharm Pharmacol* . 44,6,515-8. 1992.
 34. Beg S, Katore OP, Saini S, Garg B, Khurana RK, Singh B. Solid self-nanoemulsifying systems of

- olmesartan medoxomil: Formulation development, micromeritic characterization, in vitro and in vivo evaluation. *Powder Technol.* 294,93–104,2016.
35. Jambhekar SS. (2021) *Micromeritics and Rheology In: Theory and Practice of Contemporary Pharmaceutics*. CRC Press; p. 137– 61.
36. Indian Pharmacopoeia Commission. Indian Pharmacopoeia (2018) Vol. 1. 2018th ed. Indian Pharmacopoeia Commission; 2017.
37. Salatin S, Alami-Milani M, Cilvegar H, Fereidouni S, Maghsoodi M, Monajemzadeh F, et al. Development and characterization of bilayered tablets of diazepam for oral drug delivery: design, optimization and in vitro evaluation. *Ther Deliv* . 12,4, 132- 144, 2022.
38. Agiba AM, Abul-Ella SS, El-Monem RAA. Pharmacotechnical development and optimization of multilayered tablets: An updated industrial review with emphasis on bilayer tablets. *J. Appl. Pharm.* 55–64. 2021.
39. Kumaravelrajan, Thirumaran, Sangavi, Suba, Preparation and evaluation of active film coating tablet of teneligliptin hydrobromide hydrate with metformin hydrochloride fixed dose combination. *Indian drugs*. 58,12,22–31,2022.
40. Shan L, Yang M. Optimization and characterization of nimesulide bilayer tablets by response surface methodology. *J Chin Pharm Sci* . 23,2, 2014.
41. Peppas NA. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharm Acta Helv.* 1985;60(4):110-1.
42. Peppas NA. (2019) Mathematical models for controlled release kinetics. In: *Medical Applications of Controlled Release*. CRC Press; p. 169–88.
43. Kumaravelrajan R, Narayanan N, Suba V. Development and evaluation of controlled porosity osmotic pump for nifedipine and metoprolol combination. *Lipids Health Dis.* 10,1,51,2011.
44. Kumaravelrajan R, Mohan Raj V, Thirumaran M, Suba V. Application of factorial design in the premixing operation of diltiazem timed-release pellets. *Indian J Pharm Sci.*84(2), 2022.
45. Han JK, Kim JY, Choi DH, Park E-S. A formulation development strategy for dual- release bilayer tablets: An integrated approach of quality by design and a placebo layer. *Int J Pharm.* 618,121659,2022.

Synthesis and Biological Evaluation of some Quinazoline Derivatives

Fatimah Alhudaby¹, Duha Al-Dhalemi^{1,2}, Qais Abualassal^{1*}, Zead Abudayeh¹, Eyad Mallah³
and Luay Abu-Qatouseh⁴

¹Department of Applied Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Isra University,
11622 Amman, Jordan

²College of Pharmacy, Islamic University, Najaf, Iraq

³Department of Pharmaceutical Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy and Medical
Sciences, University of Petra, 11196 Amman, Jordan

⁴Department of Pharmacology and Biomedical Sciences, University of Petra, Amman, 11196, Jordan

KEYWORDS:

quinazoline scaffold;
anticancer; antibacterial;
spiro compounds,
antioxidant

ARTICLE INFO:

Received: April 25, 2022

Revised: June 18, 2022

Accepted: July 16, 2022

Published on line: October 18, 2022

ABSTRACT

Quinazoline scaffold was found to be a promising nucleus for the design and development of anticancer and antibacterial agents. In this work, we reported the synthesis of several quinazoline derivatives **3-7** starting from N-methylisatoic anhydride (**1**). The cytotoxicity and antibacterial activities of synthesized compounds were evaluated utilizing 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and broth microdilution test, respectively. Synthesized quinazoline compounds showed moderate anticancer and antibacterial activities and the most promising is the cytotoxicity of compound **7** in both cell lines, breast cancer (MCF-7) and human prostate cancer (PC3). Since the quinazoline nucleus is reported in literature as privileged structure, further enhancement of activity of our synthesized quinazoline derivatives could lead to the discovery of novel potential antineoplastic and antibacterial agents.

* CORRESPONDING AUTHOR:

Email: qais.abualassal@iu.edu.

jo, Tel: 00962790906530, Fax:

0096264711505

1. Introduction

A myriad of drugs and lead compounds pharmaceutically active possess heterocyclic moieties which confer a privileged physicochemical property^{1,2}. Particularly, the heteroaromatic quinazoline it is well known to be associated with several pharmacological activities, such as, anti-cancer³, anti-microbial^{4,5}, anti-cholinesterase⁶, anti-inflammatory⁷, antihypertensive⁸, sedative-hypnotic⁹, anti-histaminic¹⁰ and anti-viral activities¹¹. The quinazoline nucleus almost certainly depict one of the most important privileged structures and may

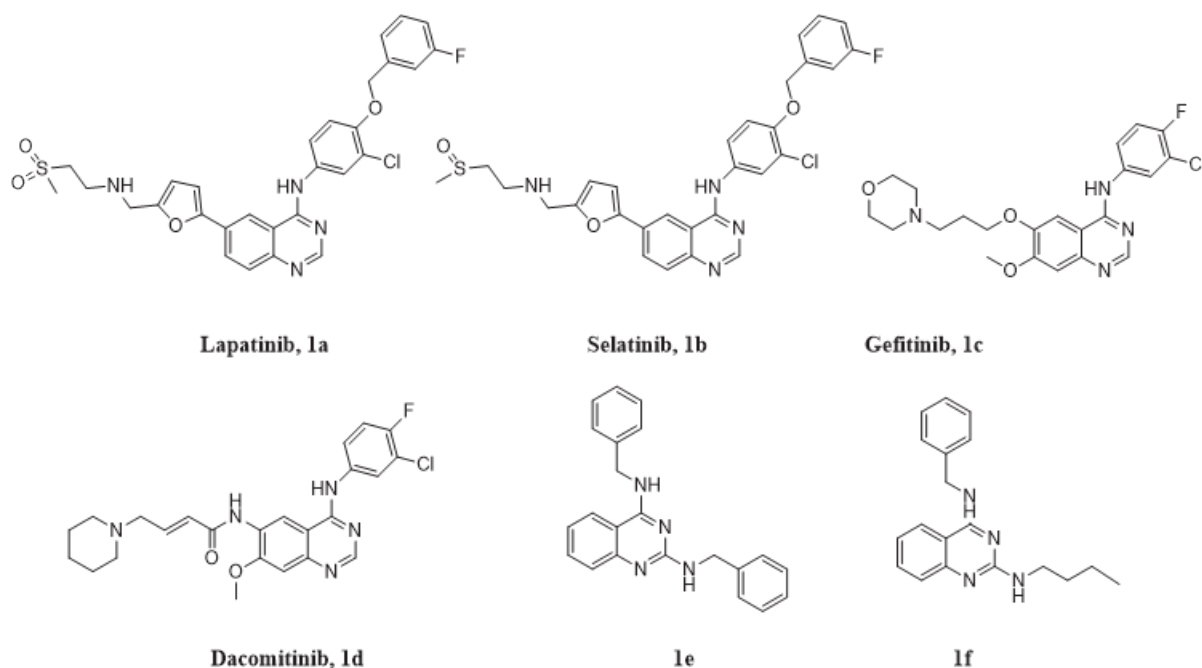


Figure 1: Quinazolines with reported anticancer and antibacterial activities.

emerge as new-fashioned approach for the discovery of new drug candidates, targeted at various biological macromolecules^{12,13}. The multiple biological activities of quinazoline derivatives have attracted the attention of pharmaceutical chemists to investigate this scaffold for its potentiality against several diseases, particularly, as anti-neoplastic¹⁴ and antibacterial lead compound¹⁵. There are many quinazoline derivatives used clinically as anticancer agents, like, gefitinib, lapatinib (**1a**), dacomitinib and a series of analogues in preclinical and clinical trials (**1b**, **Figure 1**)¹⁶⁻¹⁸.

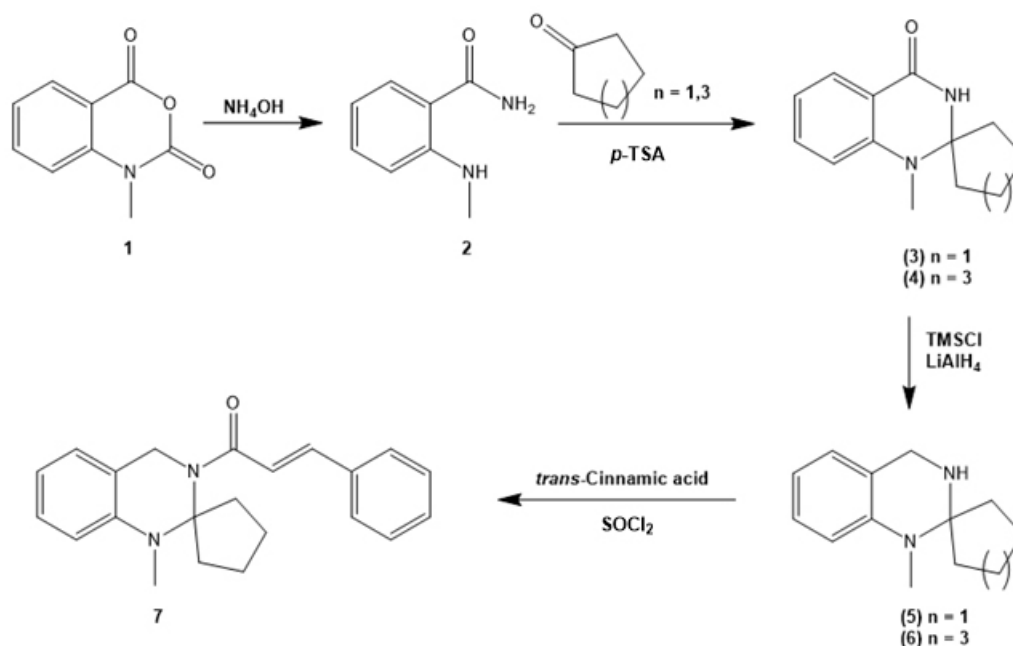
The continued manifestation of bacterial resistance against the classical antibiotics has stimulated a intensive search for new classes of agents with innovative antibacterial mode of action¹⁹⁻²¹, including quinazoline based agents. Van Horn et al. reported that some N2,N4-disubstituted quinazoline-2,4-diamines with excellent in vivo efficacy provided complete, or nearly complete protection to mice infected with lethal dose of *S. aureus*, even better than the positive control vancomycin (**1c and 1d**, **Figure 1**)²².

Due to the prevailing interest on quinazoline scaffold as anticancer and antibacterial agents, in the present work, we report the synthesis of two novel spiro-quinazoline derivatives (**4 and 6**, **Scheme 1**), as a continuation of our previous work²³⁻²⁴. Additionally, we synthesized a derivative **7** (**Scheme 1**) containing antioxidant moiety which has been conjugated to the spiro-quinazoline scaffold. The anticancer activity and cytotoxicity of the newly synthesised compounds as well as of two previously synthesised (**3, 5** **Scheme 1**) was evaluated in vitro against MCF-7 and PC3 cancer cells. Furthermore, their antibacterial activity against *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* were evaluated.

2. Experimental

2.1. Reagents and materials

All chemicals and solvents were purchased from commercially available sources and were of analytical grade. N-Methylisatoic anhydride, N, N'-Di-



Scheme 1. Synthesis of quinazoline derivatives 3-7.

cyclohexylcarbodiimide (DCC), chlorotrimethylsilane (TMSCl), LiAlH_4 , trans-cinnamic acid, SOCl_2 tetrahydrofuran (THF) were purchased from Sigma-Aldrich (UK). NH_4OH 32% from ALPHA chemika, ethylacetate from LiChrosolv®, n-hexane from Tedia®, p-toluene-4-sulfonic acid monohydrate, hydrochloric acid (HCl) 37 %, sodium sulfate (Na_2SO_4) anhydrous and DCM were purchased from (AZ chem for chemicals), methanol (GC grade in compliance to the specification of USP, BP, EP grade. Lab Chem). Reaction monitoring of the synthesized compounds was performed by Thin Layer Chromatography (TLC) on commercial silica gel 60 Å on aluminium foils with fluorescent indicator 245 nm purchased from Sigma-Aldrich.

2.2. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

GC-MS was used for the separation of the mixture components and to identify their molecular weight on the same run and was done on GC-2010 plus Shimadzu with flame ionization detector (FID). The Perkin-Elmer column length 25 m, methyl 5% phenyl silicone, 0.32 mm inner diameter 1.0 μm film thickness was used.

2.3. ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy

^1H and ^{13}C NMR spectra were acquired at 500.13 and 125.75 MHz, respectively, using a Bruker Avance III 500 spectrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany).

2.4. Cell Lines and Culture Conditions

Human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 (HB-8065), Human androgen-resistant (PC3) and Normal dermal fibroblast cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA).

MCF-7, and dermal fibroblast cells were cultured in DMEM, while PC3, were cultured in RPMI-1640 medium; media contained 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% (v/v) of penicillin (10,000 units/mL)-streptomycin (10 mg/mL), and 1% (v/v) L-glutamine (200 mM) (all from Sigma-Aldrich). All cell lines were cultured at 37°C in a 5% CO_2 , fully humidified atmosphere.

2.5. Cytotoxicity Assay

Cell lines were seeded in 96-well flat-bottomed mi-

croplates in 100 μ L culture medium at the following densities: PC3, and MCF-7 cells (3×10^3 cells/well); Dermal fibroblast cells (4.0×10^3 cells/well). Cells could adhere for 24 h. Then, the medium was replaced with fresh medium alone or with the tested compounds at increasing concentrations from 0 to 250 μ g/mL for cancerous cell lines and to 500 μ g/mL for the normal dermal fibroblast cells. The reference drugs cisplatin (0–100 μ M) and doxorubicin (0–10 μ M) were included as positive controls for growth inhibition.

After 72 h, cell viability was assayed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. All experimental conditions were tested in triplicate and the experiment was performed three times. Half maximal inhibitory concentrations (IC_{50} , the concentration required for 50% in vitro inhibition of growth) were calculated for each experiment using Graphpad prism software (Version 8, San Diego, CA, USA). IC_{50} values were reported as mean + SD.

2.6. Bacterial preparation and antimicrobial assays

2.6.1. Preparation of compounds stock solutions

Stock solutions of each compound were prepared by dissolving each pure compound in DMSO to get a solution with concentration of 1 mg/mL. Similarly, the standard antibiotics were also dissolved in DMSO and phosphate buffer saline (PBS) in a concentration of 1 mg/mL.

2.6.2. Bacterial strains and growth conditions

The following bacterial strains were employed in this investigation: *S. aureus* ATCC 29350, MRSA (clinical isolate), *E. coli* 25922, and *P. aeruginosa* 27853. The cultivation media for *P. aeruginosa* and *E. coli* were tryptone soy agar (Oxoid, UK), while 5 % defibrinated sheep blood added to Columbia blood agar base (Oxoid, UK) was the medium used for *S. aureus*. The bacterial cultures were aerobically grown at 37°C for 24 h. For antimicrobial testing, bacterial cultures were prepared by picking colonies from mid-logarithmic phase of growth and suspended in 5 mL of Mueller–Hinton broth with suitable supplements. The bacterium inoculum sizes were adjusted to be 108 CFU/mL for all strains.

2.7. Antimicrobial susceptibility testing and MIC determination

2.7.1 Disk diffusion

For the disk diffusion assay, bacterial suspensions were prepared to the standard McFarlands 0.5 and subsequently uniformly spread on a solid growth medium in a Petri dish. Sterile paper disks (6 mm in diameter; Becton, Dickinson & Co.) were placed on the surface of each agar plate and were impregnated with 20 μ L solution of each compound. Plates were incubated for the recommended time periods (24–48 h) under appropriate cultivation conditions. Antibacterial activity was determined if the tested compound produced an inhibition zone around a disk following the incubation according to the method outlined by Valgas et al.²⁵. Disks impregnated with sterile DMSO served as negative controls and disks with standard antibiotics (vancomycin, ciprofloxacin, and clarithromycin (Oxoid, UK)) served as positive controls. Measurements at each concentration were performed in triplicates.

2.7.2. Broth microdilution

For the broth microdilution test, 50 μ L of each bacterial suspension in a suitable growth medium was added to the wells of a sterile 96-well microtitre plate already containing 50 μ L of two-fold serially diluted compound or standard antibiotic in proper growth medium; the final volume in each well was 100 μ L. Control wells were prepared with culture medium, bacterial suspension only, compound only, and DMSO in amounts corresponding to the highest quantity present. The contents of each well were mixed on a microplate shaker (Eppendorf, Hamburg, Germany) at 900 rpm for 1 min prior to incubation for 24 h in the cultivation conditions described above. The MIC was recorded as the lowest concentration where no viability was observed after 24 h based on metabolic activity²⁶. To indicate respiratory activity, the presence of color was determined after adding 10 μ L/well of INT (2-p-iodophenyl-3-p-nitrophenyl-5-phenyltetrazolium chloride, Sigma) or TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, Sigma) dissolved in water (INT 2 mg/mL, TTC 20 mg/mL) and incubated under appropriate culti-

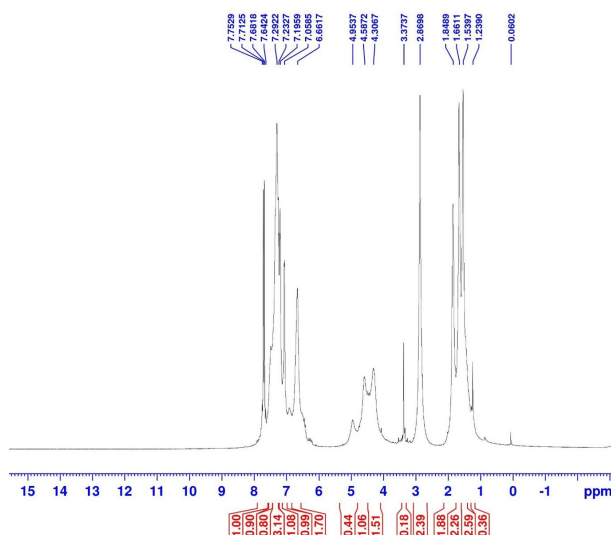


Figure 2: ^1H -NMR spectrum for compound 7

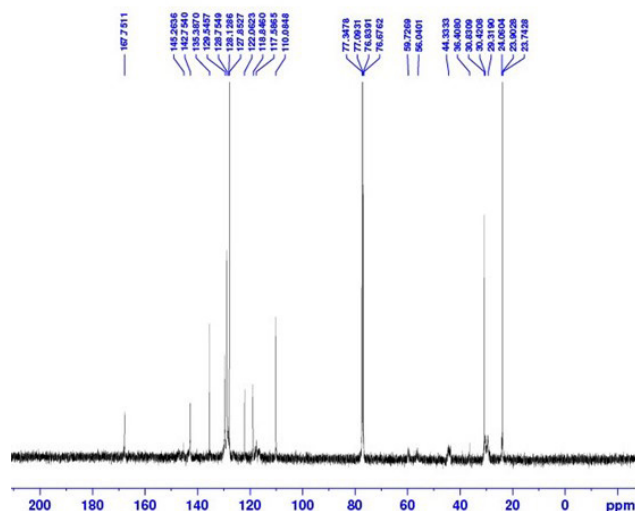


Figure 3: ^{13}C -NMR spectrum for compound 7

vation conditions for 30 min in the dark (Ellof, 1998). To determine the ATP activity, the bioluminescence signal was measured by a Microplate Reader (Tecan, Mannedorf/Zurich, Switzerland) after adding 100 μL /well of BacTiter- GloTM reagent (Promega, Madison, USA) and after 5-min incubation in the dark²⁷. Positive controls were wells with a bacterial suspension in an appropriate growth medium and a bacterial suspension in an appropriate growth medium with DMSO, in amounts corresponding to the highest quantity present in the broth microdilution assay. Negative controls were wells with growth medium and the compound. All measurements of MIC values were repeated in triplicate.

3. Results

3.1. Synthesis of quinazoline derivatives

3.1.1. 1'-methyl-1'H-spiro[cycloheptane-1,2'-quinazolin]-4'(3'H)-one (4)

A solution of 0.657 g of toluene-4-sulfonic acid monohydrate (0.00345 mol) with 10 ml cycloheptanone (0.0829 mol) were stirred to 10 min. under reflux (85-90°C).

Subsequently, compound **2** (4 g, 0.0266 mol), which dissolved in 40 ml of methanol, was added drop wise to the reaction mixture. After 4 hours the reaction was cooled down to room temperature and the stirring had been continued overnight. At the complete consumption of the starting material the organic phase was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by crystallization from hot methanol to afford (6.11 g, 94% yield) as white crystals. R_f = 0.6 (n-hexane: ethyl acetate = 1:1). ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 1.56-1.99 (m, 12H, 2'-H2 - 7'-H2) 2.81 (s, 3H, CH₃), 6.62-6.64 (d, 1H, J = 8.2 Hz, ArH), 6.76-6.79 (dd, 1H, J = 7.35, 7.25, ArH), 7.32-7.36 (dd, 1H, J = 7.8, 7.45 Hz, ArH), 7.58 (s, 1H, NH), 7.88-7.90 (d, 1H, J = 7.45, 1H, ArH). ^{13}C -NMR (125 Hz, CDCl_3): δ = 22.97 (2C, cyclohept.), 30.46 (2C, cyclohept.), 31.29 (NCH₃), 37.98 (2C, cyclohept.), 76.95 (NCN), 112.62 (arom.), 116.72 (arom.), 117.59 (arom.), 128.13 (arom.), 134.01 (arom.), 148.14 (arom.), 164.51 (CO). GC-MS: m/z = 244, (tR = 26.1 min).

3.1.2 1'-methyl-3', 4'-dihydro-1'H-spiro (cycloheptane-1, 2'-quinazoline) (6)

To a solution of **4** (1.5 g, 0.00614 mol) in 15 ml

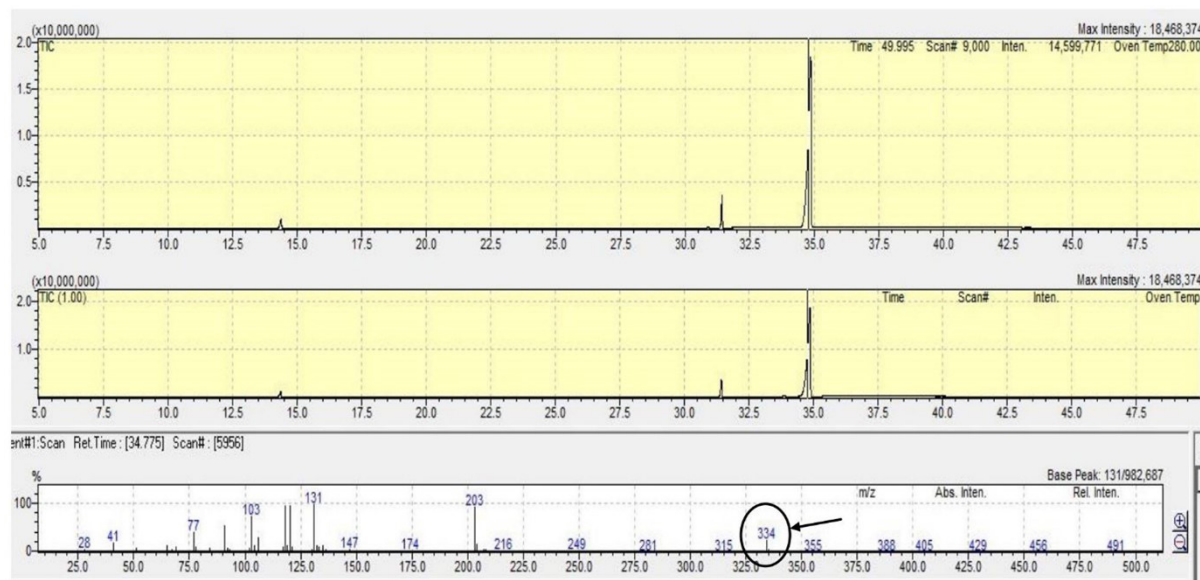


Figure 4: GC-MS spectrum for compound 7.

of THF anhydrous was added TMSCl (4.669 ml/ 0.0368 moles). The solution was stirred at room temperature for 15 minutes. then LiAlH_4 (2.796 g, 0.0786 mol) was added and allowed to stir for 2 hours more until no 4 left. the reaction was quenched adding dropwise 3.3 mL H_2O distilled water followed by adding the same quantity of aqueous sodium hydroxide, and finally adding 10 mL H_2O with constant stirring for 15 min. The reaction mixture was extracted with ethyl acetate and dried over anhydrous MgSO_4 and then concentrated under reduced pressure and gave the pure desired product without further purification as brownish oily liquid (1.42 g, 95% yield). $R_f = 0.2$ (n-hexane: ethyl acetate = 1:1). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.40$ -1.98 (m, 12H, cycloheptyl), 2.75 (s, NH, brd), 2.90 (s, 3H, CH_3), 3.82 (s, 2H, CH_2), 6.67-6.71 (m, 2H, ArH), 7.08 (d, 1H, $J = 7.1$ Hz, ArH), 7.26 (dd, 1H, $J_1 = 7.7$ Hz, $J_2 = 0.1$ Hz, ArH). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 Hz, CDCl_3): $\delta = 23.11$ (cyclohept.), 24.26 (2C, cyclohept.), 28.71 (cyclohept.), 30.24 (CH_3), 34.87 (2C, cyclohept.), 51.33 (CH_2N), 58.54 (NCN), 109.68 (arom.), 116.14 (arom.), 124.49 (arom.), 128.56 (arom.), 129.30 (arom.), 149.59 (arom.). GC-MS: $m/z = 232$, (tR = 12.5 min.).

3.1.2. (E)-1-(1'-methyl-1',4'-dihydro-3'H-spiro[cyclopentane-1,2'-quinazolin]-3'-yl)-3-phenylprop-2-en-1-one (7)

To a solution of cinnamic acid (217 mg, 0.00146 mol) in THF anhydrous were added triethylamine (608.2 μl , 0.00438 mol) and thionyl chloride (106 μl , 0.00146 mol), respectively. The solution was stirred for 5 minutes and then a solution of compound 5 (300 mg, 0.00146 mol.) in THF anhydrous was added. The reaction was monitored using TLC and GC-MS and quenched within 2 hours before quenching with deionized water. The reaction mixture was extracted with ethyl acetate and dried over anhydrous MgSO_4 and then concentrated under reduced pressure. The resulting crude product was purified by crystallization from hot methanol, to afford the title compound as white crystals with a yield of 46%. $R_f = 0.29$ (n-hexane: ethyl acetate = 4:6). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) $\delta = 1.23$ - 1.84 (m, 8H, cyclopentyl), 2.86 (s, 3H, CH_3), 4.30 (s, 2H, NCH_2), 6.66 (s, 2H, arom.), 7.05 (dd, 1H, arom.), 7.19-7.55 (m, 7H, $\text{CH}=\text{CH}$ and arom.), 7.7 (dd, 1H, arom.). (Figure 2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 Hz, CDCl_3): $\delta = 23.90$ (2C), 30.42 (2C), 36.40, 44.3, 110.08 (2C), 117.58, 118.84, 122.06,

Table 1: Reaction conditions for the synthesis of compound 7 using DCC.

| Compound 7 (eq) | DCC (eq) | Cinnamic acid (eq) | solvent | Activation time (min) | T (°C) | Yield (%) |
|-----------------|----------|--------------------|---------|-----------------------|--------|-----------|
| 1 | 1.05 | 1 | EtOAc | 0 | 50 -78 | NP |
| 1 | 4 | 4 | THF | 5 | RT | < 5 |
| 1 | 4 | 4 | THF | 15 | RT | < 5 |

*NP: No product was formed

Table 2: Optimization of reaction conditions used for the synthesis of compound 7 using SOCl₂.

| Compound 7 (eq) | SOCl ₂ (eq) | TEA (eq) | Solvent | Activation time (min) | Yield % |
|-----------------|------------------------|----------|---------------|-----------------------|---------|
| 1 | 1 | 3 | DCM | 0 | NP* |
| 1 | 1 | 3 | DCM | 5 | 30 |
| 1 | 1 | 3 | THF anhydrous | 5 | 46 |
| 1 | 1 | 3 | THF anhydrous | 10 | NP |
| 1 | 1.5 | 5 | DCM | 5 | NP |
| 1 | 1.5 | 5 | THF anhydrous | 5 | NP |

*NP: No product was formed

127.85 (2C), 128.75 (2C), 129.54 (2C), 135.38 (2C), 142.75, 145.26, 167.75. (**Figure 3**).

GC-MS: m/z = 334, (tR = 34.77 min.). (**Figure 4**).

4. Discussion

4.1. Synthetic chemistry

2-(methylamino)benzamide (**2**), 1'-methyl-1H'-spiro[cyclopentane-1, 2'-quinazolin]-4'(3'H)-one (**3**) and 1'-methyl-3', 4'-dihydro-1'Hspiro[cyclopentane-1, 2'-quinazoline] (**5**)

were synthesized with excellent yield by the previously reported methods (**Scheme 1**)^{26,27}. Regarding the synthesis of compound 4 the order of the reagent addition was fundamental to obtain an excellent yield. Firstly, reacting p-toluene sulphonic acid (p-TSA) with cycloheptanone to activate carbonyl group, whereupon after 10 minutes the addition of compound 2 to the mixture allowed the formation of the spiro compound 4. Compound 6 was formed by activation of carbonyl carbon of the amide group (compound 4) utilizing trimethylsilylchloride (TMSCl) followed by a reduction step with LiAlH₄. To optimize the reaction yield,

Table 3: Half-maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) of tested compounds in human breast, prostate, and normal dermal fibroblast. Values are mean +SD expressed in µg/mL.

| Compounds | Cell line | | |
|-------------|------------|------------|-------------------|
| | MCF-7 | PC3 | Dermal/Fibroblast |
| 3 | 80.5±12.2 | > 250 | > 500 |
| 4 | 80.5±9.7 | > 250 | > 500 |
| 5 | > 250 | > 250 | > 500 |
| 6 | 145.5±33.4 | > 250 | > 500 |
| 7 | 20.3±5.6 | 89.5 ±10.2 | 332.6 ± 14.4 |
| Doxorubicin | 0.64 ± 0.4 | 2.3 ± 1.3 | > 100 |
| cisplatin | 14.6 ± 2.8 | 16.2 ± 1.6 | > 100 |

we noticed that the optimum activation time of compound 4 with TMSCl was 15 minutes.

Compound 7 was synthesized utilizing two methods. Firstly, utilizing of dicyclohexylcarbodiimide (DCC) as activating agent for carboxylic acid group to form a good leaving group which could be subsequently displaced by the secondary amine group, but the desired product was not formed even after 24 hours. For this reason, the procedure has been modified by increasing the activation time of cinnamic acid with DCC to 5 minutes before the addition of compound 5, the target product was formed after 2 hours in a small yield (< 5%) (Table 1). Secondly, utilizing SOCl₂ as activating agent and different reaction conditions it was observed that the activation time was fundamental to increase the yield up to 46% (Table 2).

4.2. Biological evaluation

4.2.1. Cytotoxicity

The tested compounds 3-6 showed no significant activity against prostate tumor cell lines except for compound 7 with IC₅₀ of 89.5 ±10.2 µg/mL, which showed moder-

ate activity. In contrast, moderate activity against MCF-7 was observed for compounds 3, 7 and 4 with IC₅₀= 80.5±12.2 µg/mL, 20.3±5.6 µg/mL and 80.5±9.7 µg/mL respectively (Table 3). In the light of results, compound 7 exhibited to be a potential candidate as anticancer agent that belongs to this family. This biological activity could be related to the chemical modification of 5 by the introducing of cinnamoyl moiety. In literature the mechanism of action of several quinazoline derivatives is reported, according to which their anticarcinogenic activity is exhibited by inhibition of intracellular targets like topoisomerase or cyclin dependent kinases²⁸. This is will be the next step to elucidate their mode of action, for instance by molecular docking in future studies. Moreover, since the tested compounds are more effective against MCF-7 cells, potential new target candidates are suggested like epidermal growth factor receptor (EGFR)²⁹. Further investigations including gene expression analysis are required to dedicate possible mechanisms of action of these derivatives.

4.2.2. Antibacterial activity

It has been noticed that the test compounds (3-7) did

Table 4: Antimicrobial activity and MIC determination of tested compounds.

| Compounds | Antimicrobial activity | | |
|-----------|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| | Zone of inhibition (MIC value ug/mL) | | |
| | S. aureus ATCC 25923 | E. coli ATCC 25922 | P. aeruginosa ATCC 27853 |
| 3 | 0 (NP) | 0 (NP) | 0 (NA) |
| 4 | 0 (NP) | 0 (NP) | 0 (NA) |
| 5 | 0 (NP) | 12 (62.5) | 10 (125) |
| 6 | 0 (NP) | 12 (62.5) | 10 (125) |
| 7 | 0 (NP) | 0 (NP) | 0 (NA) |

NA = not active

not exhibit any antibacterial activity against Gram positive *S. aureus*. However, compounds **5** and **6** showed moderate antibacterial activity against Gram negative *P. aeruginosa* (**Table 4**). Moreover, quinazolinone derivatives **3** and **4** have demonstrated to be devoid of any antibacterial activity against Gram positive and Gram negative bacteria, which proves that quinazoline derivatives **5** and **6** (reduced structures of quinazolinones) possesses a superior activity against Gram negative bacteria. Compound **7** is lacking any antibacterial activity against tested bacterial strains, which highlights the fact that the conjugation of quinazoline nucleus with the antioxidant lipoic acid abolished the antibacterial activity.

5. Conclusion

Several quinazoline derivatives were synthesized

in a good yield. Their biological evaluation showed that compound **7** possesses promising cytotoxicity in both cell lines, breast cancer (MCF-7) and human prostate cancer (PC3). These results offer a new quinazoline-based template to design and develop novel antineoplastic and antibacterial agents, therefore, additional in vitro and in vivo studies are required to reveal their possible mechanism of action. □

Acknowledgement

The authors would like to thank Isra University and Petra University for financial support of this research project.

Conflict of interest

No conflict of interest is associated with this work.

References

1. Nikolai M.E., Artem S.K., Andrey A.Y., Mikhail Y.A., Igor V.M., Alexander K. One-step synthesis of heterocyclic privileged medicinal scaffolds by a multicomponent reaction of malononitrile with aldehydes and thiols. *J. Org. Chem.* 72, 3443-3453, 2007.
2. Alexandria P.T., Ralph P.R., Yvette M.F., David C.B-M., Lyn H.J., Olugbeminiyi F. Modern advances in heterocyclic chemistry in drug discovery. *Org. Biomol. Chem.* 14, 6611-6637, 2016.
3. Brown J.R., Byrd J.C., Coutre S.E., Benson D.M., Flinn I.W., Wagner-Johnston N.D., Spurgeon S.E., Kahl B.S., Bello C., Webb H.K., Johnson D.M., Peterman S., Li D., Jahan T.M., Lannutti B.J., Ulrich R. G., Yu A. S., Miller L.L., Furman R.R. an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110 δ , for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 123, 3390-3397, 2014.
4. Guedes P.M.D., Urbina J.A., de Lana M., Afonso L.C.C., Veloso V.M., Tafuri W.L., Machado-Coelho G.L.L., Chiari E., Bahia M.T. Activity of the new triazole derivative albaconazole against trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi in dog hosts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 286-4292, 2004.
5. McLaughlin N.P., Evans P., Pines M. The chemistry and biology of febrifugine and halofuginone. *Bioorg. Med. Chem.* 22, 1993-2004, 2014.
6. Michael D. Homobivalent quinazolinimines as novel nanomolar inhibitors of cholinesterases with dirigible selectivity toward butyrylcholinesterase. *J. Med. Chem.* 49, 5411-5413, 2006.
7. Atsuo B., Noriaki K., Haruhiko M., Yoshikazu O., Shigehisa T., Takashi S. Studies on disease-modifying antirheumatic drugs: synthesis of novel quinoline and quinazoline derivatives and their anti-inflammatory effect. *J. Med. Chem.* 39, 5176-5182, 1996.
8. Ismail M.A.H., Barker S., Abou El Ella D.A., Abou-zid K.A.M., Toubar R.A., Todd M.H. Design and synthesis of new tetrazolyl- and carbox-biphenylmethyl-quinazolin-4-one derivatives as angiotensin II AT1 receptor antagonists. *J. Med. Chem.* 49, 1526- 1535, 2006.
9. Parsons T.W., Thomson T.J. Methaqualone as a hypnotic. *Br. Med. J.* 1, 171-173, 1961.
10. Alagarsamy V., Rajani G., Yadav M.R. Synthesis and pharmacological investigation of novel 1-substituted-4-(4-substituted phenyl)-4H-[1,2,4] triazolo[4,3-a]quinazolin-5-ones as a new class of H1-antihistamine agents. *J. P. P.* 58, 1249-1255, 2006.
11. Schleiss M., Eickhoff J., Auerochs S., Leis M., Abele S., Rechter S., Choi Y., Anderson J., Scott G., Rawlinson W., Michel D., Ensminger S., Klebl B., Stamminger T., Marshall M. Protein kinase inhibitors of the quinazoline class exert anti-cytomegaloviral activity in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* 79, 49- 61. 2008.
12. Andrea C., Federica L., Salvatore B., Reto B., Luise K-S.R., Maria LB. Privileged structure-guided synthesis of quinazoline derivatives as inhibitors of trypanothione reductase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 3031-3035, 2009.
13. Ahmed K., Laxma R.K., Devaiah V., Shankaraiah N., Rao M.V. Recent advances in the solid-phase combinatorial synthetic strategies for the quinoxaline, quinazoline and benzimidazole based privileged structures. *Mini Rev. Med. Chem.* 6, 71-89, 2006.
14. Ravez S., Castillo-Aguilera O., Depreux P., Goossens L. Quinazoline derivatives as anticancer drugs: a patent review (2011 - present). *Expert Opin Ther. Pat.* 25, 789-804, 2015.
15. Kshirsagar U.A. Recent developments in the chemistry of quinazolinone alkaloids. *Org. Biomol. Chem.* 13, 9336-9353, 2015.
16. Alagarsamy V., Chitra K., Saravanan G.V, Raja S., Sulthana M.T., Narendhar B. An overview of quinazolines: Pharmacological significance and recent developments. *Eur. J. Med. Chem.* 151, 628-685, 2018.
17. Shagufta, Irshad A. An insight into the therapeutic potential of quinazoline derivatives as anticancer agents. *Med Chem commun.* 8, 871-885, 2017
18. Wang M., Kuang Y., Gong L., Hua Y., Pei Q., Guo

- C., Cao Y., Huang J., Yang G-P. First-in-human, phase I single-ascending-dose study of the safety, pharmacokinetics, and relative bioavailability of selatinib, a dual EGFR-ErbB2 inhibitor in healthy subjects. *Invest. New Drugs*. 38, 1826–1835. 2020
19. Dirk S., Wolfgang H. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch. Microbiol.* 165, 359–369, 1996.
20. Cattoir V., Leclercq R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 731–742, 2013.
21. Ramirez M.S., Tolmasky M.E. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*. 13, 151–171, 2010.
22. Van Horn K.S., Burda W.N., Fleeman R, Shaw L.N., Manetsch R. Antibacterial Activity of a Series of N2, N4-Disubstituted Quinazoline-2,4-diamines. *J. Med. Chem.* 57, 3075–3093, 2014.
23. Abualassal Q., Abudayeh Z., Hussein-Al-Ali S. Synthesis of a spiro quinazoline compound as potential drug useful in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmakeftiki*. 31, 12-20, 2019
24. Alsuhaimat R., Abualassal Q., Abudayeh Z., Ebada S., Albohy A. Synthesis and docking studies of a novel tetrahydroquinazoline derivative as promising scaffold for acetylcholine esterase inhibition. *Egypt J. Chem.* 63, 4797-4804, 2020.
25. Valgas C., de Sousa S.M., Smania E.F.A., Jr A.S. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *B. J. M.* 38, 369-380, 2007.
26. Mourey A., Canillac N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control*. 13, 289-292, 2002.
27. Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., Možina S.S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J. Microbiol. Methods*. 81, 121-126, 2010.
28. Sielecki T.M., Johnson T.L., Liu J., Muckelbauer J.K., Grafstrom R.H., Cox S. Boylan J., Burton C.R., Chen H., Smallwood A., Chang C.H., Boisclair M., Benfield P.A., Trainor G.L., Seitz S.P. Quinazolines as cyclin dependent kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 1157–1160, 2001.
29. El-Azab A.S., Al-Omar M.A., Abdel-Aziz A.A-M., Abdel-Aziz N.I., El-Sayed M.A-A., Aleisa A.M. Sayed-Ahmed M.M., Abdel-Hamide S.G. Design, synthesis, and biological evaluation of novel quinazoline derivatives as potential antitumor agents: Molecular docking study. *Eur. J. Med. Chem.* 45, 4188-4198, 2010.

ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ - MEETINGS

- **SEPTEMBER 4-8, 2022 NICE, FRANCE**

XXVII EFMC INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MEDICINAL CHEMISTRY

<https://www.efmc-ismc.org/>

- **SEPTEMBER 8-9, 2022 - NICE, FRANCE**

EFMC YOUNG MEDICINAL CHEMISTS' SYMPOSIUM

www.efmc-ymcs.org

- **SEPTEMBER 26-30, 2022. HEIDELBERG, GERMANY**

23RD EUROQSAR SYMPOSIUM, "INTEGRATIVE DATA-INTENSIVE APPROACHES TO DRUG DESIGN

www.euroqsar2022.org

- **OCTOBER 3-4, 2022 ATHENS, GREECE**

BIOAVAILABILITY- BIOEQUIVALENCE,

Info: P. Macheras, Faculty of Pharmacy, University of Athens

- **DECEMBER 15-17, 2022 IISTANBUL, TURKEY**

8TH INTERNATIONAL BAĞÇEŞEHİR UNIVERSITY (BAU) DRUG DESIGN CONGRESS

<https://www.baudrugdesign2022.com>

- **JUNE 11-14, 2023 IOANNINA, GREECE**

16TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON APPLIED BIOINORGANIC CHEMISTRY

<https://isabc2023.com/registration/>