



ISSN 1105-4999

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ PHARMAKEFTIKI

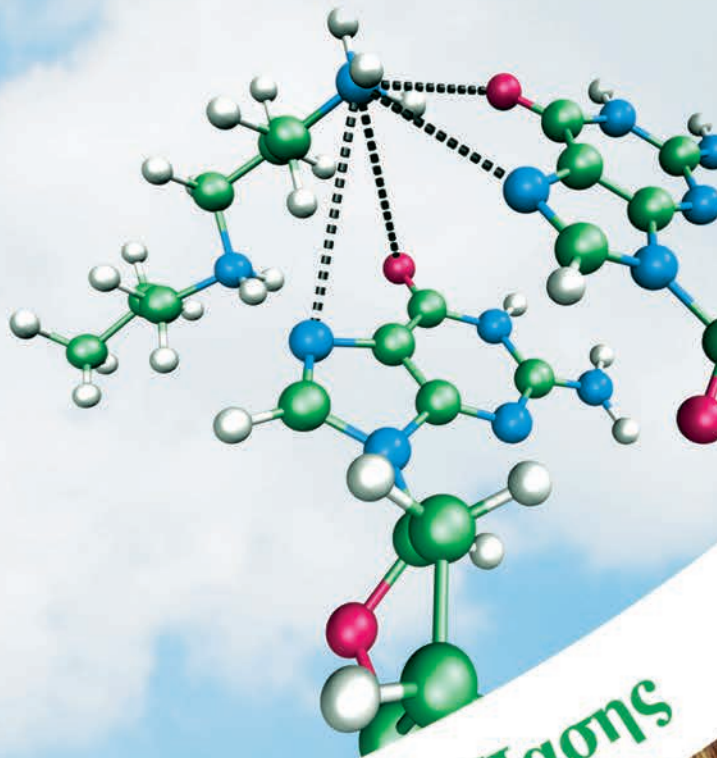
ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΜΕ ΘΕΜΑΤΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
A QUARTERLY EDITION ON PHARMACEUTICAL SCIENCES' TOPICS

ΤΟΜΟΣ 28 | ΤΕΥΧΟΣ III
VOLUME | ISSUE

ΙΟΥΛΙΟΣ - ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2016
JULY - SEPTEMBER



Galenica



Αδιάκοπη Αναζήτηση της Ύψης



Galenica α.ε.
<http://www.galenica.gr>

Νιώδεις αδυναμία;

Πολυβιταμινούχα συμπληρώματα διατροφής
με βιταμίνες, προβιοτικά & μέταλλα.



Cana Laboratories
Λεωφόρος Ηράκλειου 446,
14122 Νέο Ηράκλειο, Αττική
Τ. +30 210 2883314
E. healthcare@cana.gr
www.cana.gr

THE
BION KING



Νιώσε ξανά δυνατός!

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΜΕ ΘΕΜΑΤΑ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΟΣ 28, ΤΕΥΧΟΣ ΙΙΙ,
ΙΟΥΛΙΟΣ - ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2016

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΣΥΝΤΑΞΗΣ

A. Τσαντίλη

Ομοτ. Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
tsantili@pharm.uoa.gr

ΑΡΧΙΣΥΝΤΑΚΤΗΣ

Γ.Α. Καρίκας

Καθηγητής, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό
Ίδρυμα Αθηνών, karikasg@teiath.gr

ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κ. Δεμέτζος

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

B. Δημόπουλος

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

N. Κόλμαν

Galenica SA

X. Κοντογιώργης

PhD, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Π. Κουρουνάκης

Ομοτ. Καθηγητής,

Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Π. Μαχαίρας

Ομοτ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σ. Νικολαρόπουλος

Αναπλ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Γ. Πάιρας

Αναπλ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

E. Παντερή

Αναπλ. Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δ. Ρέκκας

Αναπλ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

E-mail για κατάθεση εργασιών:

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

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

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

PHARMAKEFTIKI

A QUARTERLY EDITION
ON PHARMACEUTICAL SCIENCES' TOPICS
VOLUME 28, ISSUE III,
JULY - SEPTEMBER 2016

EDITOR

A. Tsantili

Emeritus Professor, University of Athens,
tsantili@pharm.uoa.gr

CO EDITOR

G.A. Karikas

Professor, Technological Educational
Institute of Athens, karikasg@teiath.gr

EDITORIAL BOARD

C. Demetzos

Professor, University of Athens

V.J. Demopoulos

Professor, University of Thessaloniki

N. Kolman

Galenica SA

Ch. Kontogiorgis

PhD, University of Thessaloniki

P. Kourounakis

Emeritus Professor,

University of Thessaloniki

P. Macheras

Emeritus Professor, University of Athens

S. Nikolaropoulos

Associate Professor, University of Patras

G. Pairas

Associate Professor, University of Patras

I. Panderi

Associate Professor, University of Athens

D. Rekkas

Associate Professor, University of Athens

E-mail for manuscript submission:

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

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

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

Δεν φαινόμαστε,
αλλά είμαστε δίπλα σας



RAFARM Α.Ε.Β.Ε. ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Κορίνθου 12, 15451 Ν. Ψυχικό, Αθήνα

Τηλ.: 210 67 76 550/1 • Fax: 210 67 76 552 • e-mail: info@rafarm.gr
www.rafarm.gr

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ / CONTENTS

Μεσογειακή αναιμία (β-θαλασσαιμία) και θεραπευτικές προσεγγίσεις
Ελένη Βροντάκη, Γεωργία Μελαγράκη, Αντρέας Αφαντίτης, Θωμάς Μαυρομούστακος _____ 108 - 116

Βιοκατάλυση και Κατευθυνόμενη Εξέλιξη στην Φαρμακευτική Βιομηχανία
Νέες Εξελίξεις σε "Πράσινες" Καταλυτικές Συνθέσεις Υψηλής Αξίας Φαρμακευτικών Ουσιών
Αθανάσιος Βαλαβανίδης _____ 117 - 129

Μεγα-Δεδομένα: Ο Νέος Ορίζοντας για την Καινοτομία στις Υπηρεσίες Υγείας και στη Φαρμακευτική Έρευνα. Οι Προκλήσεις στην Ανακάλυψη Νέων Φαρμάκων
Αννα Τσαντίλη-Κακουλίδου _____ 130 - 139

Νέα από την Ελληνική Φαρμακευτική Εταιρεία _____ 140 - 141

Παρουσίαση νέων βιβλίων _____ 142

Εκδηλώσεις _____ 143 - 144

Beta-thalassaemia and therapeutic approaches
A Critical Review on the Issue of Benefit/Risk of Dietary Supplements
Eleni Vrontaki, Georgia Melagraki, Antreas Afantitis, Thomas Mavromoustakos _____ 108 - 116

Biocatalysis and Directed Evolution in the Pharmaceutical Industry. New Developments for 'Green' Synthetic Methods of High Value Pharmaceuticals
Athanasios Valavanidis _____ 117 - 129

Big Data: The New Horizon for Innovation in Health Care and Pharmaceutical Research. Challenges in Drug Discovery
Anna Tsantili-Kakoulidou _____ 130 - 139

News from the Greek Pharmaceutical Society _____ 140 - 141

Presentation of new books _____ 142

Meetings _____ 143 - 144

ZITA MEDICAL MANAGEMENT
1ο χλμ. Παιανίας - Μαρκοπούλου
19002, Παιανία, Ελλάδα
Τηλ.: + 30 211 100 1772
E-mail: t.tassou@zita-management.com

ZITA MEDICAL MANAGEMENT
1st klm Peanias - Markopoulou
19002, Peania, Greece
Tel.: + 30 211 100 1772
E-mail: t.tassou@zita-management.com



The Challenge Test Laboratory

COSMETIC TEST

COSMETIC EFFICACY

PHARMACEUTICAL TEST

ANTIMICROBIAL TEST





Από το όραμα στην πραγματικότητα...

- Website & Ηλεκτρονικό Marketing
- Επιστημονικές Εκδόσεις
- Χορηγίες
- Γραφιστικό - Δημιουργικό
- Γραμματειακή Υποστήριξη
- Τουρισμός Υγείας
- Νοσοκομειακό Marketing
- Γραφείο Τύπου

**Η αποτελεσματικότητα είναι...
η δική μας επιστήμη**

www.zita-management.com



ΛΙΠΟΣΩΜΙΑΚΕΣ ΦΟΡΜΟΥΛΕΣ

Συμπληρώματα Διατροφής

...το μέλλον των συμπληρωμάτων διατροφής

ΤΑ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ

- Τα λιποσώματα είναι καινοτόμα συστήματα μεταφοράς συμπληρωμάτων διατροφής.
- Βελτιώνουν τη απορρόφηση βιταμινών και βιοδραστικών μορίων, καθώς και τη βιοδιαθεσιμότητά τους.
- Τα συμπληρώματα διατροφής βασισμένα στην τεχνολογία των λιποσωμάτων αυξάνουν την απορρόφησή τους, και κατά συνέπεια και την αποτελεσματικότητά τους.
- Τα συμπληρώματα διατροφής της **Doctor's Formulas** περιέχουν λιποσώματα* με αυξημένη αποτελεσματικότητα.

* συγκέντρωση λιπιδίων - δομικών συστατικών των λιποσωμάτων από 25 έως 100mg/ml.



www.doctorsformulas.com

Μεσογειακή αναιμία (β-θαλασσαιμία) και θεραπευτικές προσεγγίσεις

Ελένη Βροντάκη^{1,2*}, Γεωργία Μελαγράκη², Αντρέας Αφαντίτης², Θωμάς Μαυρομούστακος¹

¹Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου, 15784, Αθήνα, Ελλάδα

²Τμήμα Χημειοπληροφορικής, NovaMechanics Ltd, Λευκωσία, Κύπρος

Περίληψη

Η μεσογειακή αναιμία (ή β-θαλασσαιμία) είναι μια κοινή διαταραχή του αίματος, που μειώνει την παραγωγή της αιμοσφαιρίνης (Hb) και εμφανίζεται σε όλες τις περιοχές της υφελίου. Η φαρμακολογική επανενεργοποίηση του γονιδίου της γ-σφαιρίνης για την παραγωγή της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (HbF) αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική οδό για τη νόσο. Η ερυθρολευχαιμική ανθρώπινη κυτταρική σειρά K562 έχει τη δυνατότητα να εκφράσει

τη γ- αλλά όχι τη β-σφαιρίνη. Η διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων K562 σχετίζεται με την αύξηση στην έκφραση των γονιδίων της εμβρυϊκής σφαιρίνης, όπως των γονιδίων της ζ, ε, και γ-σφαιρίνης. Αυτό το χαρακτηριστικό καθιστά τα κύτταρα K562 ένα ευρέως χρήσιμο μοντέλο κυτταρικής σειράς για τη μελέτη ενώσεων που είναι δυνητικοί επαγωγείς της γ-σφαιρίνης στη θεραπεία της β-θαλασσαιμίας.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Μεσογειακή αναιμία, εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη (HbF), γ-σφαιρίνη, επαγωγείς HbF, κύτταρα K562

1. Γενικά για τη β-θαλασσαιμία

Η μεσογειακή αναιμία ή β-θαλασσαιμία[#], όπως έχει επικρατήσει να ονομάζεται τα τελευταία χρόνια σε διεθνές επίπεδο, είναι μια κοινή διαταραχή του αίματος που απαντάται σε όλο τον κόσμο. Τα άτομα που πάσχουν από τη νόσο δεν μπορούν να συνθέσουν τη φυσιολογική μορφή της αιμοσφαιρίνης (Hb), η οποία μεταφέρει το οξυγόνο στους ιστούς και αποτελεί βασικό συστατικό του αίματος. Η φυσιολογική μορφή της αιμοσφαιρίνης αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, δύο α και δύο β αλυσίδες (σφαιρίνες) σε ένα τετραμερές. Οι πάσχοντες από

β-θαλασσαιμία παράγουν μειωμένη τη β-σφαιρίνη.

Πιο συγκεκριμένα, η διαταραχή αυτή μειώνει την παραγωγή της αιμοσφαιρίνης και είναι εξειδικευμένη σε σοβαρές κληρονομικές μεταλλάξεις στη δομή της β-αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης, ή σε διαταραχές στη σύνθεσή της^{1,2}. Σε ασθενείς με β-θαλασσαιμία, η ανισορροπία στη σύνθεση των β-αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης οδηγεί σε καθίζηση περίσσειας αδρανών α-αλυσίδων μέσα στα ερυθροκύτταρα, σε σημεία στο εσωτερικό και εξωτερικό του μυελού, ενώ σχηματίζονται μικρά, ευαίσθητα ερυθρά αιμοσφαίρια που αδυνατούν να μεταφέρουν επαρκώς το οξυγόνο και καταστρέφονται εύκολα (σχήμα 1).

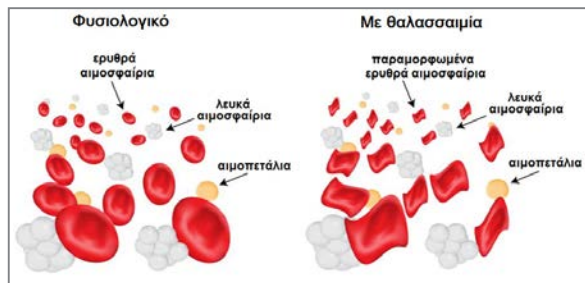
[#]Σε ιατρικά βιβλία η θαλασσαιμία εμφανίζεται και με άλλες ονομασίες, όπως β-ομόζυγος θαλασσαιμία, β-μείζονα θαλασσαιμία, μεσογειακή αναιμία ή αναιμία του Cooley (Cooley's anaemia, 1928).

*Συγγραφέας για αλληλογραφία: Ελένη Βροντάκη, E-mail: evrontaki@chem.uoa.gr

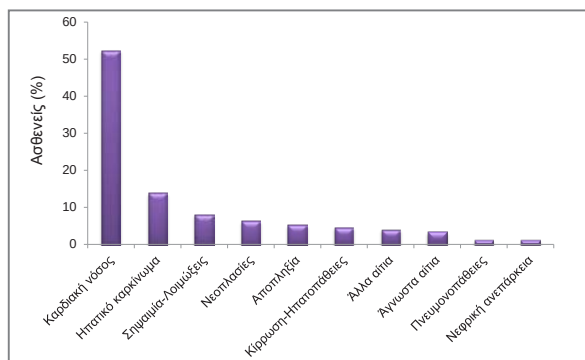
Ως εκ τούτου, συμπεραίνεται ότι η παθοφυσιολογία της β-θαλασσαιμίας έχει δύο σκέλη: (α) τη μειωμένη πλήρωση των ερυθροκυττάρων με αιμοσφαιρίνη, και (β) τη δημιουργία των καταστροφικών εγκλείστων από την περίσσεια ελεύθερων α-αλυσίδων. Η νόσος ταξινομείται ως β⁰, όταν η σύνθεση της β-σφαιρίνης αναστέλλεται ολοσχερώς, β⁺, όταν η σύνθεση μειώνεται σοβαρά και β⁺⁺, όταν η σύνθεση μειώνεται ήπια. Έχουν περιγραφεί τρεις κύριοι τύποι της νόσου: η ελάσσων, η ενδιάμεση, και η μείζων.

Χιλιάδες βρέφη με μεσογειακή αναιμία γεννιούνται κάθε χρόνο, καθώς κληρονομείται και από τους δύο γονείς που είναι φορείς της νόσου. Η μεσογειακή αναιμία εμφανίζεται συχνότερα σε ανθρώπους από τις χώρες της Μεσογείου, τη Βόρεια Αφρική, τη Μέση Ανατολή, την Ινδία, την Κεντρική και τη Νοτιοανατολική Ασία. Στην Ελλάδα (και κυρίως στην Κρήτη) και την Κύπρο, τα ποσοστά φορέων της νόσου είναι από τα υψηλότερα στον κόσμο, και επομένως η νόσος συγκαταλέγεται ως σοβαρό κλινικό πρόβλημα. Υπολογίζεται, ότι 240 εκατομμύρια άτομα σε όλο τον κόσμο είναι ετερόζυγα για μεσογειακή αναιμία, ενώ περίπου 200.000 ετησίως είναι οι ομοζυγώτες.

Η νόσος, χωρίς μια αυστηρή θεραπευτική αγωγή, είναι θανατηφόρα και μέχρι στιγμής ανίατη, με εξαίρεση λίγα άτομα που έχουν ισοσυμβατό συγγενή δότη αιμοποιητικών κυττάρων, ώστε να μπορούν να επωφεληθούν μιας μεταμόσχευσης. Η παρούσα αγωγή που ακολουθείται είναι η τακτική μετάγγιση αίματος και η αποσιδήρωση, δηλαδή η αφαίρεση του σιδήρου που συσσωρεύεται από τις μεταγίσεις, και μπορεί να βλάψει ζωτικά όργανα (καρδιά, ήπαρ, ενδοκρινείς αδένες). Μάλιστα, παλαιότερα το συχνότερο αίτιο θανάτου όσων έπασχαν από μεσογειακή αναιμία ήταν η καρδιακή ανεπάρκεια (σχήμα 2), ενώ αντισώματα του ιού της ηπατίτιδας C έχουν βρεθεί σε μεγάλο ποσοστό των πολυμεταγγιζόμενων ασθενών^{3,4}. Πιο συγκεκριμένα, αντισώματα του HCV έχουν βρεθεί σε ποσοστό 85% των πολυμεταγγιζόμενων ασθενών με β-θαλασσαιμία στην Ιταλία, 23% στο Ηνωμένο Βασίλειο, 35% στις Ηνωμένες Πολιτείες, 34% στη Γαλλία και 21% στην Ινδία³. Αυτό το γεγονός οφείλεται στο ότι τα πολυμεταγγιζόμενα άτομα είναι πιο επιρρεπή σε τέτοιου είδους ιογενείς λοιμώξεις, όπως στον ιό της ηπατίτιδας B και C, και του HIV. Στην Ελλάδα, τονίζεται



Σχήμα 1. Η παθοφυσιολογία της β-θαλασσαιμίας



Σχήμα 2. Αιτίες θνησιμότητας θαλασσαιμικών ασθενών στην Ελλάδα (Ελληνικό Εθνικό Αρχείο Καταγραφής 2000-2010)⁴

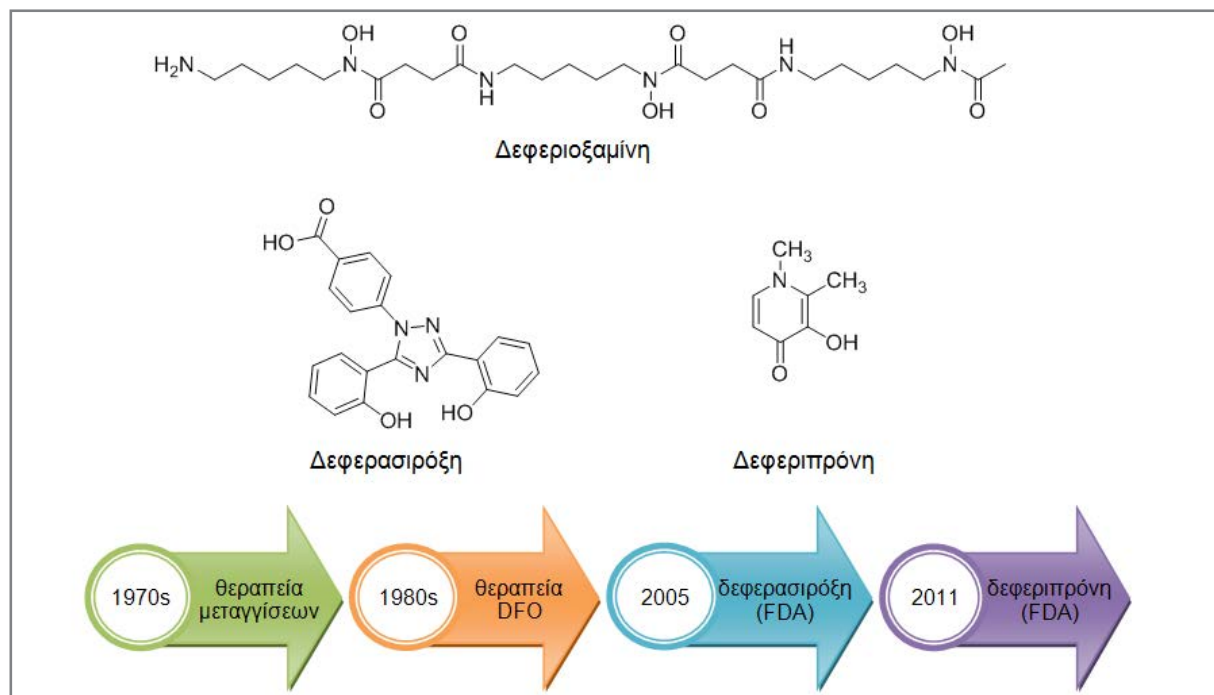
πως η αφαίρεση του σιδήρου μπορεί να χαρίζει τη ζωή, αλλά εν τούτοις παραμένει μια δύσκολη και δαπανηρή τεχνική. Ως εκ τούτου, η ανακάλυψη φαρμακευτικών μορίων ενάντια σε αυτή τη νόσο κρίνεται αναγκαία.

2. Θεραπευτική αντιμετώπιση της β-θαλασσαιμίας

Μέχρι σήμερα, η β-θαλασσαιμία θεραπεύεται εν μέρει με τακτικές μεταγίσεις αίματος, την αποσιδήρωση, και με την αντιμετώπιση δευτερογενών συμπτωμάτων. Η μεταμόσχευση μυελού αποτελεί τη μοναδική ριζική θεραπεία, ενώ η γονιδιακή θεραπεία βρίσκεται ακόμα σε ερευνητικό στάδιο.

2.1 Μεταγίσεις

Ο βασικός τρόπος αντιμετώπισης της αναιμίας είναι οι μεταγίσεις αίματος (συμπυκνωμένων ερυθρών). Περισσότερες και πιο συχνές μεταγίσεις απαιτούνται στις σοβαρές μορφές β-θαλασσαιμίας, πιθανόν κάθε λίγες εβδομάδες. Ακόμη, τακτικές μεταγίσεις απαιτούνται σε απότομη πτώση αιμο-



Σχήμα 3. Η εξέλιξη στη θεραπεία αποσιδήρωσης

σφαιρίνης, όπως κατά τη διάρκεια λοιμώξεων, μετά από χειρουργικές επεμβάσεις και κατά την εγκυμοσύνη. Πριν ξεκινήσουν οι μεταγγίσεις, απαραίτητο είναι να γίνει εκτενής φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των ερυθροκυττάρων.

2.2 Αποσιδήρωση

Οι τακτικές μεταγγίσεις αίματος προκαλούν συσσώρευση του σιδήρου στο αίμα (αιμοσιδήρωση). Στη β-θαλασσαιμία παρατηρείται αυξημένη απορρόφηση σιδήρου και από το πεπτικό σύστημα. Ο σίδηρος οδηγεί σταδιακά στην καταστροφή των κυττάρων, με αποτέλεσμα τη λειτουργική ανεπάρκεια ζωτικών οργάνων (όπως καρδιά, ήπαρ). Δυστυχώς δεν υπάρχουν φυσιολογικοί μηχανισμοί για την αποβολή του σιδήρου στο αίμα, κι έτσι η θεραπεία με χηλικούς παράγοντες δέσμευσης του σιδήρου αποτελεί τη μόνη μέθοδο για να μειωθεί ή να διατηρηθεί σταθερό το φορτίο σιδήρου στον οργανισμό ασθενών με β-θαλασσαιμία. Η δεφεριοξαμίνη (Deferrioxamine ή Desferal, DFO) ήταν η πρώτη χηλική ουσία που χρησιμοποιήθηκε για την αποσιδήρωση και έχει εφαρμοσθεί για μακρόχρονο διάστημα εφαρμόζοντας υποδόρια έγχυση

με χρήση ειδικής αντλίας. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ενδοφλέβια σε ισχυρότερες δόσεις. Σήμερα είναι διαθέσιμοι και οι δια του στόματος χηλικοί παράγοντες αποσιδήρωσης, δεφεριπρόνη (Deferiprone, Ferriprox)⁵ και δεφερασιρόξη (Deferasirox, Exjade)^{6,7}. Μάλιστα, η συνδυαστική θεραπεία αποσιδήρωσης με δεφεριοξαμίνη και δεφεριπρόνη εφαρμόζεται σήμερα ως η πλέον αποτελεσματική. Η δεφεριπρόνη έχει την ικανότητα να απομακρύνει τον σίδηρο κυρίως από την καρδιά, ενώ σε συνδυασμό με τη δεφεριοξαμίνη δρα συνεργικά και αποβάλλει τον σίδηρο και από τα άλλα όργανα. Η δεφερασιρόξη έχει εγκριθεί ως μονοθεραπεία πρώτης γραμμής στη μείζονα θαλασσαιμία σε περισσότερες από 70 χώρες παγκοσμίως, συμπεριλαμβανομένων των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (2005) και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (2006) (σχήμα 3).

2.3 Επαγωγείς της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης

Η ανθρώπινη ερυθρολευχαιμική κυτταρική σειρά K562, που απομονώθηκε από έναν ασθενή με χρόνια μυελογενή λευχαιμία (CML)^{8,9} σε βλαστική κρίση και χαρακτηρίστηκε από τους C.B Lozzio και

B.B Lozzio¹⁰, έχει την ικανότητα να υπερεκφράσει το γονίδιο της γ- αλλά όχι της β-σφαιρίνης. Η διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων K562 σχετίζεται με την αύξηση στην έκφραση των γονιδίων της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης, όπως των γονιδίων της ζ-, ε-, και γ-σφαιρίνης¹¹. Αυτό το χαρακτηριστικό καθιστά τα κύτταρα K562 ένα ευρέως χρήσιμο μοντέλο κυτταρικής σειράς *in vitro* για τη μελέτη ενώσεων που είναι δυνητικοί επαγωγείς της γ-σφαιρίνης για χρήση τους στη δρεπανοκυτταρική νόσο (SCD), καθώς και για τη μελέτη του μοριακού μηχανισμού(-ών) που ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων της ανθρώπινης εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης στη β-θαλασσαιμία¹².

Η φαρμακολογική επανενεργοποίηση του γονιδίου της γ-σφαιρίνης είναι μια ελκυστική θεραπευτική στρατηγική για τη θεραπεία της β-θαλασσαιμίας και της SCD. Η αυξημένη παραγωγή του γονιδίου της γ-σφαιρίνης μπορεί να βελτιώσει τα συμπτώματα της νόσου με τη μείωση του πολυμερισμού της δρεπανοκυτταρικής Hb (HbS) στην SCD, και εν μέρει την υποκατάσταση του μη λειτουργικού γονιδίου της β-σφαιρίνης στη β-θαλασσαιμία, αποκαθιστώντας την ισορροπία μεταξύ α και μη-α αλυσίδων σφαιρίνης¹³. Έχει αποδειχθεί ότι τα μόρια που επάγουν τη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων K562 είναι συχνά σε θέση να ενεργοποιήσουν την έκφραση της γ-σφαιρίνης σε ερυθροειδή πρωτογενή κύτταρα που απομονώνονται από ασθενείς με SCD ή β-θαλασσαιμία¹⁴. Τα κύτταρα K562 διαφοροποιούνται μέχρι το τελικό στάδιο της ωρίμανσης και χάνουν την ικανότητά τους να πολλαπλασιαστούν.

Η αποκατάσταση της ανισορροπίας παραγωγής απρος μη-α αλυσίδων της φυσιολογικής αιμοσφαιρίνης μπορεί να γίνει με αύξηση της παραγωγής της γ-αλυσίδας¹⁵. Κυτταροτοξικά φάρμακα, παράγοντες ανάπτυξης, και παράγοντες που επάγουν τη διαφοροποίηση είναι γνωστά ως ομάδες παραγόντων που αυξάνουν την παραγωγή της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης στον άνθρωπο¹⁶. Η ποικιλία των φαρμακολογικών επαγωγικών παραγόντων ομαδοποιούνται σε διάφορες κατηγορίες, συμπεριλαμβανομένων των ερυθροποιητίνης (EPO), βουτυρικού νατρίου, 5-αζακυτιδίνης και υδροξουρίας (HU), θαλιδομίδης κ.ά.^{13,16-18}

Η υδροξουρία είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη ουσία για την παραγωγή γ-σφαιρίνης, ενώ

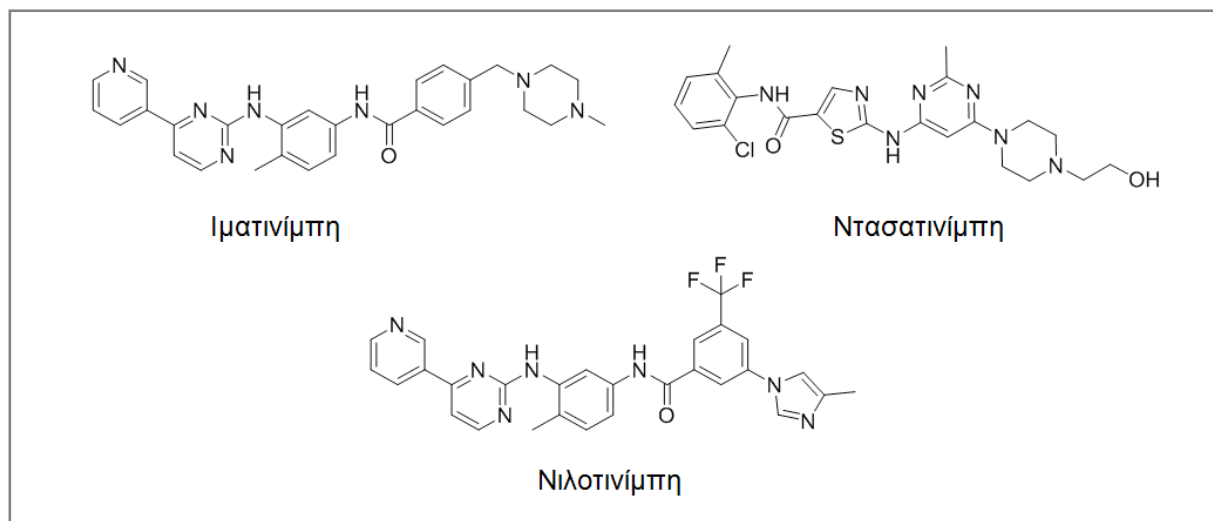
αποτελεί φάρμακο επιλογής για την SCD, και άλλες μυελικές κακοήθειες κυρίως ως παρηγορητική θεραπεία για τον έλεγχο του αριθμού των λευκοκυττάρων. Έχει δειχθεί όμως ότι η μακροχρόνια χρήση της μπορεί να προκαλέσει τη σχετική απώλεια της αρχικής ευεργετικής της δράσης¹⁹. Ακόμη, αύξηση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης επιτυγχάνεται με τη χρήση των λιπαρών οξέων βραχείας αλυσού, ενώ επιθυμητά αποτελέσματα είχαν η 5-αζακυτιδίνη και η θαλιδομίδη^{16,20-22}. Για την περαιτέρω ενεργοποίηση της ερυθροποίησης έχουν χρησιμοποιηθεί αυξητικοί παράγοντες ερυθροποίησης, όπως είναι η ερυθροποιητίνη και η δαρβοποετίνη^{18,23,24}.

Παρόλο που είναι αρκετά γνωστό ότι οι επαγωγείς της HbF μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανά φάρμακα για την φαρμακολογική θεραπεία της β-θαλασσαιμίας, τα προαναφερθέντα φάρμακα που διατίθενται σήμερα για τον σκοπό αυτόν έχουν περιορισμένη εφαρμογή λόγω της χαμηλής τους αποτελεσματικότητας και εξειδίκευσης, καθώς και των δυνάμει κυτταροτοξικών (καρκινογόνων) επιδράσεών τους. Ως εκ τούτου, κρίνεται άμεσης ανάγκης ο εντοπισμός νέων τύπων παραγόντων που μπορούν να επάγουν την παραγωγή της HbF με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και χαμηλότερη τοξικότητα, και αποτελεί νέο ορίζοντα στη θεραπεία της β-θαλασσαιμίας.

2.3.1. Η κινάση BCR-ABL ως θεραπευτικός στόχος για τη χρόνια μυελογενή λευχαιμία

Η προαναφερθείσα κυτταρική σειρά K562 είναι μια θετική κυτταρική σειρά της CML BCR-ABL και χρησιμοποιείται ευρέως για τον εντοπισμό ισχυρών αναστολέων της κινάσης BCR-ABL. Η BCR-ABL είναι μία χιμαιρική πρωτεΐνη, μονίμως δραστική τυροσινική κινάση που προάγει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό σημάτων μέσω πολλαπλών βιοχημικών οδών που βρίσκονται κάτω από αυτή (π.χ. Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K, JAK/STAT) και σχετίζονται με την παραγωγή λευκών αιμοσφαιρίων²⁵⁻²⁷. Μεταλλακτική ανάλυση αποκάλυψε ότι η δραστικότητα της κινάσης είναι αναγκαία για τον κακοήγη μετασχηματισμό, καθιστώντας την κινάση BCR-ABL έναν ελκυστικό θεραπευτικό στόχο για τη χρόνια μυελογενή λευχαιμία^{28,29}.

Αποτελεί ενδιαφέρον ότι, τα θετικά κύτταρα BCR-



Σχήμα 4. Οι χημικές δομές των ιματινίμπης, ντασατινίμπης και νιλοτινίμπης

ABL φαίνονται να είναι ανθεκτικά στην απόπτωση, αλλά η μείωση της δραστηριότητας της κινάσης τους τα καθιστά ευαίσθητα στην απόπτωση που επάγεται από χημειοθεραπευτικό παράγοντα³⁰. Για τον λόγο αυτόν, πρόσφατες μελέτες προτείνουν συνδυασμένη χρήση ενός αναστολέα της BCR-ABL με έναν αντικαρκινικό παράγοντα για τη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (CML)^{31, 32}. Μια τέτοια συνδυαστική φαρμακευτική αγωγή προσφέρει τη δυνατότητα μείωσης της δόσης των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, και ως εκ τούτου, τυχόν ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με τη χρήση τους. Αναστολείς της BCR-ABL φαίνεται ότι μπορούν συμβάλουν και ως επαγωγείς της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης.

Η μεθανοσουλφονική ιματινίμπη (imatinib, STI571, *Gleevec*, Novartis, *σχήμα 4*) είναι ο πρώτος και πολύ γνωστός, εδώ και δέκα χρόνια, πρώτης γενιάς αναστολέας της BCR-ABL, ο οποίος ανταγωνίζεται το ATP στο τμήμα της κινάσης BCR-ABL όπου προσδένεται³³. Παρόλο που η ιματινίμπη, όπως αναφέρθηκε, είναι η θεραπεία πρώτης γραμμής για τις περισσότερες περιπτώσεις της CML, ένας σημαντικός αριθμός ασθενών εμφανίζουν ανθεκτικότητα στο φάρμακο³⁴. Η ανθεκτικότητα αυτή οφείλεται κυρίως σε μεταλλάξεις εντός της θέσης πρόσδεσης του ATP στο γονίδιο της BCR-ABL που εμποδίζουν την αλληλεπίδραση της ιματινίμπης με την περιοχή

της κινάσης BCR-ABL^{34,35}. Οι αναστολείς δεύτερης γενιάς της BCR-ABL είναι επίσης ανταγωνιστές των μορίων ATP και θα μπορούσαν δυνητικά να παρουσιάζουν τα ίδια προβλήματα, όπως η θεραπεία με την ιματινίμπη³⁶. Επομένως, οι μη-ανταγωνιστές του ATP μπορούν να είναι καλύτεροι υποψήφια φάρμακα για τη θεραπεία της CML.

Για αυτόν τον λόγο πιο πρόσφατα, χρησιμοποιούνται οι αναστολείς δεύτερης γενιάς της ιματινίμπης, οι ντασατινίμπη (dasatinib, BMS-354825, *Sprycel*, Bristol Myers Squibb, *σχήμα 4*) και νιλοτινίμπη (nilotinib, AMN107, *Tasigna*, Novartis, *σχήμα 4*). Οι αναστολείς αυτοί είναι δραστικότεροι από την ιματινίμπη, έχουν εμφανίσει ταχύτερα αποτελέσματα, ενώ οι ανεπιθύμητες ενέργειες από τη χρήση τους διαφέρουν από αυτές της ιματινίμπης^{37,38}, και κατά συνέπεια, χρησιμοποιούνται με επιτυχία, όταν η θεραπεία με την ιματινίμπη δεν μπορεί να δοθεί λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών.

2.4 Σπληνεκτομή

Ο σπλήνας υπερπλάσσεται στους ασθενείς με ενδιάμεση β-θαλασσαιμία (υπερσπληνισμός). Ο υπερσπληνισμός οφείλεται κυρίως στην υπερλειτουργία του σπλήνα λόγω της καταστροφής μεγάλου αριθμού «ελαττωματικών» ερυθρών αιμοσφαιρίων, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις, κυρίως τα παλαιότερα χρόνια, οφειλόταν σε πλημμελείς μεταγγίσεις. Κατά

συνέπεια, οι ασθενείς πολλές φορές μπορεί να χρειαστεί να υποβληθούν σε αφαίρεση του σπλήνα (σπληνεκτομή). Μετά τη σπληνεκτομή, υπάρχει βελτίωση της αναιμίας για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα. Δεδομένου όμως, ότι η σπληνεκτομή έχει συσχετισθεί με αυξημένη πιθανότητα επιπλοκών, όπως θρομβοεμβολικά επεισόδια και πνευμονική υπέρταση, πρέπει να γίνεται μετά από σοβαρό προβληματισμό και εξάντληση άλλων εναλλακτικών τρόπων θεραπείας³⁹.

2.5 Μεταμόσχευση μυελού των οστών

Η μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων, ή όπως επιστημονικά ονομάζεται η αλλογενής μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων (ΜΑΚ), μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε σοβαρές και επιλεγμένες περιπτώσεις, αποτελώντας τη μοναδική ριζική θεραπεία της νόσου. Πριν από τη μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων, πρέπει να λαμβάνονται πολύ υψηλές δόσεις φαρμάκων ή ακτινοβολίας για την καταστροφή του παθολογικού μυελού των οστών. Στη συνέχεια, λαμβάνονται εγχύσεις βλαστοκυττάρων από συμβατό δότη. Ωστόσο, επειδή αυτές οι διαδικασίες έχουν σοβαρούς κινδύνους, συμπεριλαμβανομένου του θανάτου, γενικά προορίζονται για τα άτομα με την πιο σοβαρή μορφή της νόσου τα οποία έχουν στη διάθεσή τους έναν απόλυτα ταιριαστό δότη μυελού των οστών - συνήθως έναν αδελφό ή αδελφή⁴⁰.

2.6 Γονιδιακή θεραπεία

Ως μελλοντικός στόχος για τη ριζική θεραπεία της β-θαλασσαιμίας αποτελεί η γονιδιακή θεραπεία, για

την οποία γίνονται συντονισμένες και εκτεταμένες προσπάθειες⁴¹.

3. Συμπεράσματα

Η πρόοδος στη συμβατική θεραπεία έχει βελτιώσει σημαντικά την επιβίωση των θαλασσαιμικών ασθενών. Η θεραπεία με τις μεταγγίσεις και η αποσιδήρωση, παράλληλα με διαρκή πολυπαραμετρικό έλεγχο των ασθενών έχουν ελαττώσει την θνησιμότητα σε μεγάλο βαθμό την τελευταία δεκαετία. Τα καρδιακά αίτια δεν αποτελούν πλέον την κύρια αιτία θανάτου, όταν ακολουθείται συστηματική και ελεγχόμενη θεραπεία αποσιδήρωσης. Για αυτό και δεν σταματάει η εξέλιξη στη θεραπεία αποσιδήρωσης προς όλο και ισχυρότερους χηλικούς παράγοντες και καλύτερης εκτίμησης του φορτίου του σιδήρου στο αίμα.

Η μεταμόσχευση του μυελού είναι επιτυχής στους νεαρούς ασθενείς με πλήρως συμβατό συγγενή δότη, ενώ η γονιδιακή θεραπεία υπόσχεται λαμπρό μέλλον. Τέλος, η επαγωγή της HbF με νεότερα ασφαλή σκεύασμα αποτελεί εναλλακτική στοχευμένη θεραπευτική προσέγγιση. Το σημαντικότερο όμως συμπέρασμα είναι ότι η ασφαλής μετάγγιση και η θεραπεία αποσιδήρωσης παραμένουν οι ακρογωνιαίοι λίθοι της αντιμετώπισης της θαλασσαιμίας. Ωστόσο, η ενθάρρυνση και ευαισθητοποίηση της κοινής γνώμης σχετικά με τους θαλασσαιμικούς ασθενείς και τα προβλήματά τους μπορεί να αλλάξει την αρνητική στάση απέναντι στη νόσο και να συμβάλει σε σημαντικό βαθμό στη διεξαγωγή προγεννητικού ελέγχου. □

Beta-Thalassaemia and Therapeutic Approaches

Eleni Vrontaki^{1,2*}, Georgia Melagraki², Antreas Afantitis², Thomas Mavromoustakos¹

¹*Laboratory of Organic Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Panepistimiopolis, Zografou, 15784, Athens, Greece*

²*Department of Chemoinformatics, NovaMechanics Ltd, Nicosia, Cyprus*

Abstract

Beta-thalassaemia is a common blood disorder spread worldwide, that reduces the production of hemoglobin (Hb). Pharmacological reactivation of the γ -globin gene for the production

of fetal haemoglobin (HbF) is a very promising therapeutic avenue for treating the disease. K562 human erythroleukemic cell line has the potential to highly express the γ - but not the β -globin gene. Erythroid differentiation of K562 cells is associated with an increase in the expression of embryo-fetal globin genes such as ζ , ϵ , and γ -globin genes. This characteristic makes K562 cells a widely useful model cell line for the study of compounds that are potential γ -globin inducers for use to treat β -thalassaemia.

KEYWORDS: Beta-thalassaemia; fetal haemoglobin (HbF); γ -globin; HbF inducers; K562 cell line

References

1. Thein S.L. Genetic insights into the clinical diversity of beta thalassaemia. *Br. J. Haematol.* 124, 264-74, 2004.
2. Old J.M. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. *Blood Rev.* 17, 43-53, 2003.
3. Borgna-Pignatti C., Cappellini M.D., De Stefano P., Del Vecchio G.C., Forni G.L., Gamberini M.R., Ghilardi R., Origà R., Piga A., Romeo M.A., Zhao H., Cnaan A. Survival and complications in thalassaemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1054, 40-47, 2005.
4. Voskaridou E., Ladis V., Kattamis A., Hassapopoulou E., Economou M., Kourakli A., Maragkos K., Kontogianni K., Lafioniatis S., Vrettou E., Koutsouka F., Papadakis A., Mihos A., Eftihiadis E., Farmaki K., Papageorgiou O., Tapaki G., Maili P., Theohari M., Drosou M., Kartasis Z., Aggelaki M., Basileiadi A., Adamopoulos I., Lafiatis I., Galanopoulos A., Xanthopoulidis G., Dimitriadou E., Mprimi A., Stamatopoulou M., Haile E.D., Tsironi M., Anastasiadis A., Kalmanti M., Papadopoulos M., Panori E., Dimoxenou P., Tsirka A., Georgakopoulos D., Drandakis P., Dionisopoulou D., Ntalama A., Davros I., Karagiorga M. on behalf of the Greek Haemoglobinopathies Study Group. A national registry of haemoglobinopathies in Greece: Deducted demographics, trends in mortality and affected births. *Ann. Hematol.* 91, 1451-58, 2012.
5. Pootrakul P., Sirankapracha P., Sankote J., Kachintorn U., Maungsub W., Sriphen K., Thakernpol K., Atisuk K., Fucharoen S., Chantlaluk Sri U., Shalev O., Hoffbrand A.V. Clinical trial of deferiprone iron chelation therapy in beta-thalassaemia/haemoglobin E patients in Thailand. *Br. J. Haematol.* 122, 305-10, 2003.
6. Voskaridou E., Plata E., Douskou M., Papadakis M., Delaki E.E., Christoulas D., Terpos E. Treatment, with deferasirox (Exjade) effectively decreases iron burden in patients with thalassaemia intermedia: results of a pilot study. *Br. J. Haematol.* 148, 332-34, 2010.
7. Ladis V., Berdousi H., Gotsis E., Kattamis A. Deferasirox administration for the treatment of non-transfusional iron overload in patients with thalassaemia intermedia. *Br. J. Haematol.* 151, 504-508, 2010.

8. Deininger M.W., Goldman J.M., Melo J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96, 3343-56, 2000.
9. Kurzrock R., Gutterman J.U., Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N. Engl. J. Med.* 319, 990-98, 1998.
10. Lozzio C.B., Lozzio B.B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45, 321-34, 1975.
11. Rutherford T.R., Clegg J.B., Weatherall D.J. K562 human leukaemic cells synthesise embryonic haemoglobin in response to haemin. *Nature* 280, 164-65, 1979.
12. Rutherford T., Clegg J.B., Higgs D.R., Jones R.W., Thompson J., Weatherall D.J. Embryonic erythroid differentiation in the human leukemic cell line K562. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 78, 348-52, 1981.
13. Olivieri N.F., Weatherall D.J. The therapeutic reactivation of fetal haemoglobin. *Hum. Mol. Genet.* 7, 1655-58, 1998.
14. Gambari R., Fibach E. Medicinal chemistry of fetal hemoglobin inducers for treatment of beta-thalassemia. *Curr. Med. Chem.* 14, 199-212, 2007.
15. Taher A.T., Musallam K. M., Cappellini M.D., Weatherall D.J. Optimal management of β thalassaemia intermedia. *Br. J. Haematol.* 152, 512-23, 2011.
16. Dover G.J., Brusilow S., Samid D. Increased fetal haemoglobin in patients receiving sodium 4-phenylbutyrate. *N. Engl. J. Med.* 327, 569-70, 1992.
17. Fathallah H., Atweh G. Induction of fetal hemoglobin in the treatment of sickle cell disease. *Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 58-62, 2006.
18. Rodgers G.P., Dover G.J., Uyesaka N., Noguchi C.T., Schechter A.N., Nienhuis A.W. Augmentation by erythropoietin of fetal-hemoglobin response to hydroxyurea in sickle cell disease. *N. Engl. J. Med.* 328, 73-80, 1993.
19. Rigano P., Pecoraro A., Calzolari R., Troia A., Acuto S., Renda D., Pantalone G.R., Maggio A., Di Marzo R. Desensitization to hydroxycarbamide following long-term treatment of thalassaemia intermedia as observed *in vivo* and in primary erythroid cultures from treated patients. *Br. J. Haematol.* 151, 509-15, 2010.
20. Weinberg R.S., Ji X., Sutton M., Perrine S., Galperin Y., Li Q., Liebhauer S.A., Stamatoyannopoulos G., Atweh G.F. Butyrate increases the efficiency of translation of gammaglobin mRNA. *Blood* 105, 1807-9, 2005.
21. Masera N., Tavecchia L., Capra M., Cazzaniga G., Vimercati C., Pozzi L., Biondi A., Masera G. Optimal response to thalidomide in a patient with thalassaemia major resistant to conventional therapy. *Blood Transfus.* 8, 63-65, 2010.
22. Aguilar-Lopez L.B., Delgado-Lamas J.L., Rubio-Jurado B., Perea F.J., Ibarra B. Thalidomide therapy in a patient with thalassemia major. *Blood Cells Mol. Dis.* 41, 136-137, 2008.
23. Bourantas K., Economou G., Georgiou J. Administration of high doses of recombinant human erythropoietin to patients with beta-thalassemia intermedia: a preliminary trial. *Eur. J. Haematol.* 58, 22-25, 1997.
24. Singer S.T., Vichinsky E.P., Sweeters N., Rachmilewitz E. Darbepoetin alfa for the treatment of anaemia in alpha- or beta-thalassaemia intermedia syndromes. *Br. J. Haematol.* 154, 281-284, 2011.
25. Cowan-Jacob S.W., Guez V., Fendrich G., Griffin J.D., Fabbro D., Furet P., Liebetanz J., Mestan J., Manley P.W. Imatinib (STI571) resistance in chronic myelogenous leukemia: molecular basis of the underlying mechanisms and potential strategies for treatment. *Mini Rev. Med. Chem.* 4, 285-99, 2004.
26. Quintas-Cardama A., Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 113, 1619-30, 2009.
27. Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* 5, 172-83, 2005.
28. Cortez D., Kadlec L., Pendergast A.M. Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 5, 5531-41, 1995.
29. Lugo T.G., Pendergast A.M., Muller A.J., Witte O.N. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 247, 1079-82, 1990.

30. McGahon A.J., Brown D.G., Martin S.J., Amarante-Mendes G.P., Cotter T.G., Cohen G.M., Green D.R. Downregulation of Bcr-Abl in K562 cells restores susceptibility to apoptosis: characterization of the apoptotic death. *Cell Death Differ.* 4, 95-104, 1997.
31. Gu J.J., Santiago L., Mitchell B.S. Synergy between imatinib and mycophenolic acid in inducing apoptosis in cell lines expressing Bcr-Abl. *Blood* 105, 3270-77, 2005.
32. Jakubowska J., Stasiak M., Szulawska A., Bednarek A., Czyz M. Combined effects of doxorubicin and STI571 on growth, differentiation and apoptosis of CML cell line K562. *Acta Biochim. Pol.* 54, 839-46, 2007.
33. Schindler T., Bornmann W., Pellicena P., Miller W.T., Clarkson B., Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 289, 1938-42, 2000.
34. Shah N.P., Sawyers C.L. Mechanisms of resistance to STI571 in Philadelphia chromosome-associated leukemias. *Oncogene* 22, 7389-95, 2003.
35. Sawyers C.L. Opportunities and challenges in the development of kinase inhibitor therapy for cancer. *Genes Dev.* 17, 2998-3010, 2003.
36. Reddy M.V., Pallela V.R., Cosenza S.C., Mallired-digari M.R., Patti R., Bonagura M., Truongcao M., Akula B., Jatiani S.S., Reddy E.P. Design, synthesis and evaluation of (E)-alpha-benzylthio chalcones as novel inhibitors of BCR-ABL kinase. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 2317-26, 2010.
37. Wei G., Rafiyath S., Liu D. First-line treatment for chronic myeloid leukemia: dasatinib, nilotinib, or imatinib. *J. Hematol. Oncol.* 3, 47, 2010.
38. Weisberg E., Manley P.W., Cowan-Jacob S.W., Hochhaus A., Griffin J.D. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* 7, 345-56, 2007.
39. Taher A., Khaled M.M., Karimi M., El-Beshlawy A., Belhoul K., Daar S., Saned M.-S.E., El-Chafic A.-H., Fasulo M.R., Cappellini M.D. Overview on practices in thalassemia intermedia management aiming for lowering complication rates across a region of endemicity: the OPTIMAL CARE study. *Blood* 115, 1886-92, 2010.
40. Giardini C., Lucarelli G. Bone marrow transplantation in the treatment of thalassemia. *Curr. Opin. Hematol.* 1, 170-6, 1994.
41. Raja J. V., Rachchh M. A., Gokani R. H. Recent advances in gene therapy for thalassemia. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* 4, 194-201, 2012.

Biocatalysis and Directed Evolution in the Pharmaceutical Industry. New Developments for 'Green' Synthetic Methods of High Value Pharmaceuticals

Athanasios Valavanidis

Department of Chemistry, University of Athens, University Campus Zografou, 15784 Athens, Greece

Summary

The pharmaceutical industry embraced Green Chemistry principles in the last decades for the development of drugs with innovative green synthetic methods. Biocatalysis has been adopted as the main organic chemistry synthetic technology by the fine chemicals and pharmaceutical industries. Heterogeneously catalyzed processes using supported metal or molecular catalysts are still an exception. Since then, enzymes have assumed an increasing importance in industrial processes that involve organic chemical reactions. Although enzymes are efficient for catalysis do not fulfill the requirements for harsh industrial conditions. Optimization of their catalytic efficiency is necessary to obtain a suitable enzyme catalyst. The first approach is rational design, which targets specific residues of a protein for mutagenesis to predetermined amino acid mutations, and is only applicable when there is detailed knowledge of the relationships between the enzyme's structure and biocatalytic mechanism. The second method is the tailoring of an enzyme for efficient catalysis by the new methodology of direct-

ed evolution. Directed evolution (DE) has been established after many years of research as an experimental method in protein engineering that mimics the process of natural selection in living cells (bacteria or yeast). The first step is the generation of a library of variant genes after directed mutagenesis. Then scientists apply error prone PCR on both genes and subsequently screen the mutated libraries. Screening thousands of the mutated clones from the libraries some are selected which demonstrate higher levels of catalytic activities or thermostability, as compared to the wild type enzyme. Many recent advances in DE produced suitable protein-enzymes with desirable catalytic function. These enzymes had numerous successful applications in the synthesis of pharmaceuticals. The method provides support to 'green chemistry' principles. This review covers innovative biocatalytic methods and directed evolution techniques in the pharmaceutical industry, as well as the fast advances of the last years in the 'green' synthesis of well known drugs with high market value.

KEYWORDS: Green Chemistry; green synthetic methods; biocatalysis; directed evolution; enzyme engineering; new pharmaceuticals

Corresponding author: Prof. Athanasios Valavanidis, E-mail: valavanidis@chem.uoa.gr

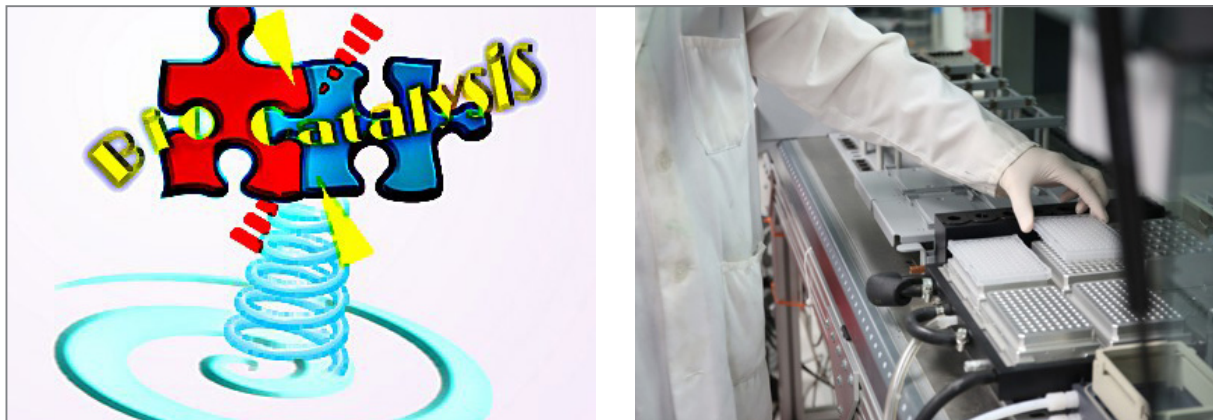


Figure 1. Manufacturing Chemist Designing enzyme-based platforms- biocatalysis [<http://www.manufacturingchemist.com/>]

1. Introduction: Green Chemistry, biocatalysis and the pharmaceutical industry

In the last decades the pharmaceutical industry embraced Green Chemistry principles in the development of drugs with innovative green synthetic methods. Now, new medical products are produced mainly by processes which are using less toxic raw materials, green solvents, energy efficiency and give substantially less toxic waste¹⁻³.

Biocatalysis has become the main Green Chemistry technology adopted by the fine chemicals and pharmaceutical industries to manufacture chemicals with higher yield. In addition, biocatalysis provides processes which are shorter, produce less waste and reduce manufacturing costs and environmental impact. Heterogeneously catalyzed processes using supported metal or molecular catalysts are nowadays an exception.

Early enzyme products developed for industrial applications were produced by native hosts via fermentation and consisted of a complex mixture of secreted enzymes produced at low yields. Now, over 90% of industrial enzymes are produced recombinantly for maximal purity and productivity (figure 1)⁴.

In the last decade biocatalysis, taking into account the latest breakthroughs in genomics and proteomics, rapidly evolved into a key synthetic technology especially in the pharmaceutical industry. The reasons are that the main synthetic problems in the

pharmaceutical industry were high yielding chemo-, regio-, and enantioselective reactions which could be solved by special catalytic reactions. The frontier subjects for research and development in these fields were combinatorial biosynthesis, emerging enzymes, metabolite profiling, metabolic engineering, and autonomous enzymes for the synthesis and development of chiral molecules, drug metabolites, and semi-synthetic medicinal compounds and natural product analogs⁵.

Enzymes are known to catalyze and regulate chemical reactions in all living organisms. But at the same time enzymes had from the past valuable food applications, like the fermenting of wine and brewing of beer. Since then, enzymes have assumed an increasing importance in industrial processes that involve organic chemical reactions. Although enzymes are efficient for catalysis, naturally occurring enzymes do not fulfill the requirements for harsh industrial conditions, and optimization is necessary to obtain a suitable enzyme catalyst. This tailoring of enzymes can be accomplished through two experimental routes. The first is rational design, which targets specific residues of a protein for mutagenesis to predetermined amino acid mutations, and is only applicable when there is detailed knowledge of the relationships between the enzyme's structure and biocatalytic mechanism. The second method is the tailoring of an enzyme for efficient catalysis by the new methodology of directed evolution^{6,7}.

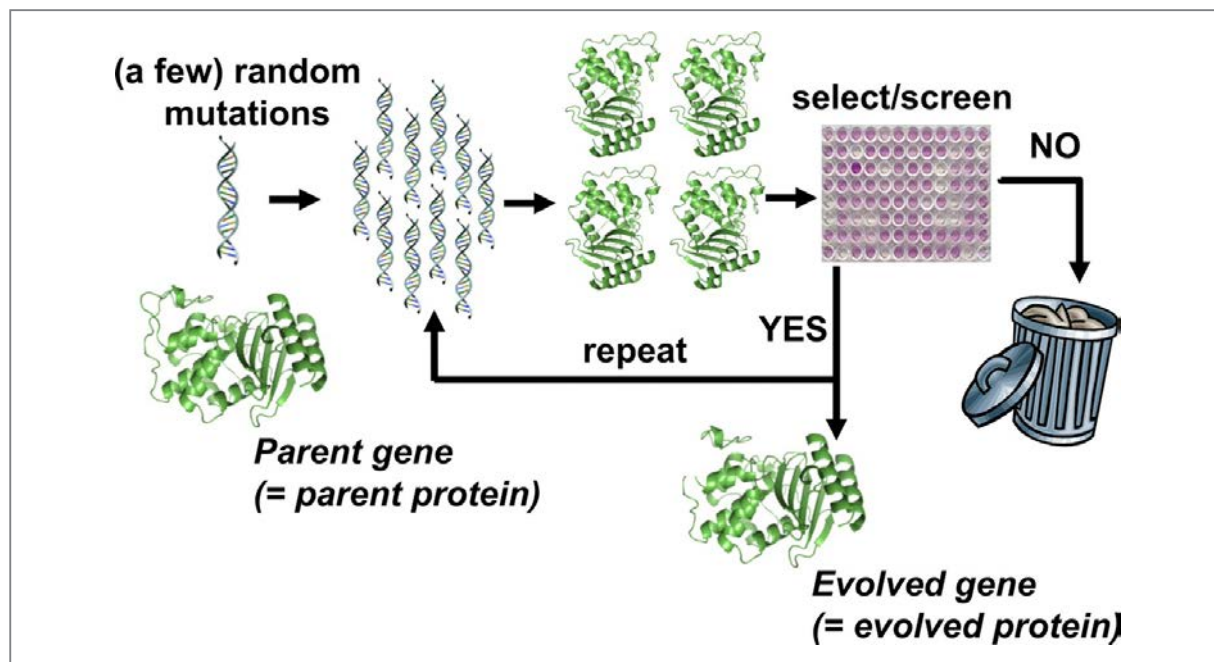


Figure 2. Directed evolution. Schematic outline of typical experiment of directed evolution. In the light of directed evolution: Pathways of adaptive protein evolution, *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. [http://www.pnas.org/content/106/Supplement_1/9995/F1.expansion.html] adapted from ref. PNAS, Vol. 106 (supplement 1): 16 June, 2009¹¹

2. Directed evolution, protein engineering and biocatalysis

Directed evolution (DE) has been established after many years of research as an experimental method in protein engineering that mimics the process of natural selection. The result is proteins or nucleic acids leading finally to a selection of a suitable protein-enzyme with desirable catalytic function. The method starts with subjecting a gene to iterative rounds of mutagenesis (creating a library of variants), selection (expressing the variants and isolating members with the desired function), and amplification (generating a template for the next round). It can be performed *in vivo* (in living cells), or *in vitro* (free in solution or microdroplet). Directed evolution is used both for protein engineering as an alternative to rationally designing modified proteins, as well as for studies of fundamental evolutionary principles in a controlled, laboratory environment⁸.

Directed evolution looks like an iterative Darwinian optimization process, whereby the fittest variants

are selected from an ensemble of mutants and can be used to target a number of enzymatic characteristics, including activity, substrate specificity, thermal and oxidative stability, enantioselectivity or enantiospecificity, pH optima or range, and tolerance to solvent^{9,10}.

The well established methodology begins with the gene for the parent protein which is randomly mutagenized by using error-prone PCR. Error-prone PCR (polymerase chain reaction) is a method by which random mutants are inserted into any piece of DNA. In error-prone PCR the fidelity of the Taq DNA polymerase is modulated by alteration of the composition of the reaction buffer. Taq is a thermostable DNA polymerase named after the thermophilic bacterium *Thermus aquaticus* which is frequently used in the PCR for amplifying the quantity of short segments of DNA. The library of mutant genes is then used to produce mutant proteins. These proteins are screened or selected for the desired target property. For example, for improved enzymatic catalytic activity or for increased stability in industrial

reactions. Mutants that fail to show improvements in the screening/selection process are discarded. The genes of the improved mutants are used as the parents for the next round of mutagenesis and screening. The procedure is repeated until the proteins that are produced exhibit the desired level of the target property (e.g. efficient enzymatic catalysis of a certain reaction) (*figure 2*)¹¹.

Directed evolution has advanced very fast in the last decade and is nowadays a widely used experimental strategy for improving the catalytic activities and stabilities of proteins-enzymes by repeated rounds of mutations and selection. This methodology revealed that single amino acid mutations can enhance catalytic properties of proteins and that adaptation can be achieved through sequential beneficial mutations. In this respect directed evolution has rapidly emerged as a powerful new strategy for improving the characteristics of enzymes in a targeted manner. By coupling various protocols for generating large variant libraries of genes, together with high-throughput screens that select for specific properties of an enzyme, such as thermostability, catalytic activity and substrate specificity, it is now possible to optimize biocatalysts for specific applications (industrial biocatalysis)¹².

In May 2016, Prof. Frances Arnold an internationally recognized American scientist (Prof. Chemical Engineering, Bioengineering and Biochemistry, CalTech, USA) was awarded by the Technology Academy Finland the prestigious Millennium Technology Prize (1 million Euros) for her pioneered methods of directed evolution to create catalytic enzymes. She is the first female winner of this award.

Stereo- and regioselective enzymes constitute a highly desirable and prolific source of biocatalysts for asymmetric transformations in organic chemistry and for the pharmaceutical industry. Directed evolution emerged as a key methodology in achieving this target by saturation mutagenesis at sites lining the binding pocket of enzymes, but uncertainties in research in this field still persist despite the innovative advances. Two new approaches promise to beat the problem effectively. One utilizes a single amino acid as building block for the randomization of a 10-residue site, the other also employs only one

but possibly different amino acid at each position of a 9-residue site. The small but smart libraries provide highly enantioselective epoxide hydrolase or lipase mutants, respectively¹³.

The cytochrome P450-dependent monooxygenases constitute the primary enzyme system responsible for the oxidative metabolism of a variety of xenobiotics and endogenous compounds including drugs, carcinogens, fatty acids and hormones. The catalytic properties of Cytochrome P450 enzyme monooxygenases (CYP) are of considerable interest for the synthesis of novel drugs and drug metabolites, and targeted cancer gene therapy. However, their applications to industrial drug synthesis are limited because cytochrome P450 show a low turnover rate and stability¹⁴. In recent years there has been an increasing realization among scientists of the power of CYP biocatalysts for the industrial synthesis of bulk chemicals, pharmaceuticals, agrochemicals, and food ingredients, especially when high regio- and stereoselective hydroxylation is required¹⁵.

Directed evolution of the monooxygenase P450-BM3 (Cytochrome P450 BM3 from the soil bacterium *Bacillus megaterium*) utilizing saturation mutagenesis at and near the binding site enables a high degree of both regio- and enantioselectivity in the oxidative hydroxylation of cyclohexene-1-carboxylic acid methyl ester. Mutants enabling *R* selectivity (>95 % *ee*, enantiomeric excess) or *S* selectivity (>95 % *ee*) were evolved, while reducing other oxidation products and thus maximizing regioselectivity to >93 %. An *E. coli* strain capable of NADPH regeneration was also engineered, simplifying directed evolution of P450 enzymes in general. These synthetic results set the stage for subsequent stereoselective and stereospecific chemical transformations to form more complex compounds¹⁶.

After a long period of research efforts for enzyme engineering by directed evolution (which became a rapidly emerging method of choice) in academic laboratories there is now a vast array of biocatalysts used in the production of a wide range of pharmaceutically important molecules, such as in the production of precursors, intermediates, and complete compounds of importance to the pharmaceutical

industry, including polyketides, nonribosomal peptides, steroids, vitamins, and unnatural amino acids.

3. Biocatalytic processes, directed evolution, pharmaceutical synthesis

Biocatalysis has advanced into the pharmaceuticals industry because of its advantages in accelerating reactions, lack of intermediates and less waste. But the inherent complexity of natural biological systems has restricted the generalized application of this approach in industrial processes. The biocatalytic problems have been solved to a great extent by 'Directed evolution' that has allowed significant strides to be made in the field of synthetic enzymes with desired properties from large libraries of variants and their application in a great variety of pharmaceuticals and intermediate syntheses^{17,18}. A book for the green synthesis of drugs is edited by Zhang and Cue¹⁹.

Some typical examples in drug synthesis are given in the following sections.

3.1. Sitagliptin, an antidiabetic drug

An interesting example of green chemistry synthesis and directed evolution methodology is the drug Sitagliptin (marketed under the trade name Januvia by Merck & Co) an oral antihyperglycemic drug (antidiabetic medicine) for treatment of diabetes mellitus type 2 (figure 3). The benefit of this medicine is its fewer side effects (e.g., less hypoglycemia, less weight gain) in the control of blood glucose values. Sitagliptin is a well known antidiabetic drug, which was synthesized at a large scale²⁰. In recent years the

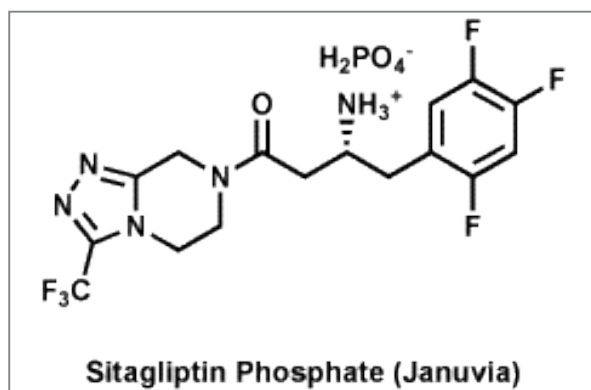


Figure 3. Chemical structure of Sitagliptin

large scale synthesis of Sitagliptin has been benefited substantially by an efficient biocatalytic process that replaced the Rhodium-catalyzed asymmetric enamine hydrogenation²¹.

The biocatalytic synthesis starts from an enzyme that had the catalytic machinery to perform the desired chemistry but lacked any activity toward the pro-sitagliptin ketone. Scientists applied the mutation approach to create a transaminase with marginal activity for the synthesis of the chiral amine, this variant was then further engineered via directed evolution for practical application in a manufacturing setting. The resultant biocatalysts showed broad applicability toward the synthesis of chiral amines. This biocatalysis according to scientists underscores the maturation of biocatalytic methods for efficiency, environmental benign processes and manufactures of pharmaceuticals^{22,23}.

3.2. Atorvastatin, a cholesterol-lowering drug

The cholesterol-lowering drug Atorvastatin (marketed commercially as Lipitor), is another successful example in the pharmaceutical synthetic process where biocatalysis research and directed evolution methodology have been applied extensively. The enzyme 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase (DERA) has been a target of directed evolution for the production of atorvastatin intermediates²⁴⁻²⁶. Researchers used structure-based biocatalysis for mutagenesis in an attempt to expand the substrate specificity of the native enzyme. The enzyme variants were fully purified and assayed *in vitro* by monitoring the decrease of NADH at 340 nm. One variant, S238D, showed new activity towards 3-azidopropinaldehyde to form an azido pyranose which is an intermediate in atorvastatin synthesis^{24,25}.

Enzyme DERA catalyzes the reversible aldol reaction between acetaldehyde and D-glyceraldehyde-3-phosphate to generate D-2-deoxyribose-5-phosphate. This is unique catalytically among the aldolases as it catalyzes the reversible asymmetric aldol addition reaction of two aldehydes. In order to expand the substrate scope and stereoselectivity of DERA site-specific mutations has been investigated and five site-directed mutants were designed in order to improve its activity (the S238D variant

exhibited a 2.5-fold improvement over the wild-type enzyme). Interestingly, this S238D mutant enzyme was shown to accept 3-azidopropinaldehyde as a substrate in a sequential asymmetric aldol reaction to form a deoxy-azidoethyl pyranose, precursor to the corresponding lactone and the cholesterol-lowering agent Atorvastatin calcium (Lipitor™, Pfizer)²⁴.

Some other researchers applied gene site saturation mutagenesis (GSSM) technology for the directed evolution of a nitrilase which effectively catalyzes the desymmetrization of the prochiral substrate 3-hydroxyglutaronitrile to afford (*R*)-4-cyano-3-hydroxybutyric acid, a precursor to the valuable cholesterol-lowering drug Lipitor (*figure 4*). Through GSSM, a mutagenesis technique, that effects the combinatorial saturation of each amino acid in the protein to each of the other 19 amino acids, combined with a novel high-throughput mass spectroscopy assay, a number of improved variants were identified, the best of which is the Ala190His mutant that yields product enantiomeric excess of 98.5%²⁵.

GSSM is an invaluable technique for studying protein and gene function in molecular biology. The method was applied in protein engineering fields based on innovative gene synthesis and PCR technology with very interesting results.

Jennewein and co-workers studied this wild-type enzyme, creating a library with error-prone PCR and recombining positive mutants. By screening mutants with a microplate reader or with gas chromatography, they managed to increase the synthesis of the intermediate (3*R*,5*S*)-6-chloro-2,4,6-trideoxyhexapyranoside by 10-fold²⁶. Aldolases are emerging as powerful and cost efficient tools for

the industrial synthesis of chiral molecules. They catalyze enantioselective carbon-carbon bond formations, generating up to two chiral centers under mild reaction conditions. In this paper researchers applied directed evolution to optimize *Escherichia coli* 2-deoxy-D-ribose 5-phosphate aldolase (DERA) as biocatalyst for the industrial synthesis of (3*R*,5*S*)-6-chloro-2,4,6-trideoxyhexapyranoside. This versatile chiral precursor for Vastatin drugs like Lipitor (Atorvastatin) was synthesized by DERA in a tandem-aldol reaction from chloroacetaldehyde and two acetaldehyde equivalents. However, *E. coli* DERA shows low affinity to chloroacetaldehyde and is rapidly inactivated at aldehyde concentrations useful for biocatalysis. Using high-throughput screenings for chloroacetaldehyde resistance and for higher productivity, several improved variants have been identified. By combination of the most beneficial mutations scientists obtained a 10-fold improved variant²⁶.

Codexis International Co. (U.S. Europe and India) is a well known world leader in providing unique, state-of-the-art enzyme optimization services and developing biocatalyst products. Research teams in Codexis accelerate the development of manufacturing processes for active pharmaceutical ingredients (APIs), fine chemicals, agrochemicals, food ingredients, detergents and biofuels. They also enable rapid transfer to commercial manufacturing scale. Codexis scientists developed proprietary and cutting-edge CodeEvolver® protein engineering platform which allows rapid development of highly optimized enzymes that are used in new, highly efficient and environmentally friendly biocatalytic

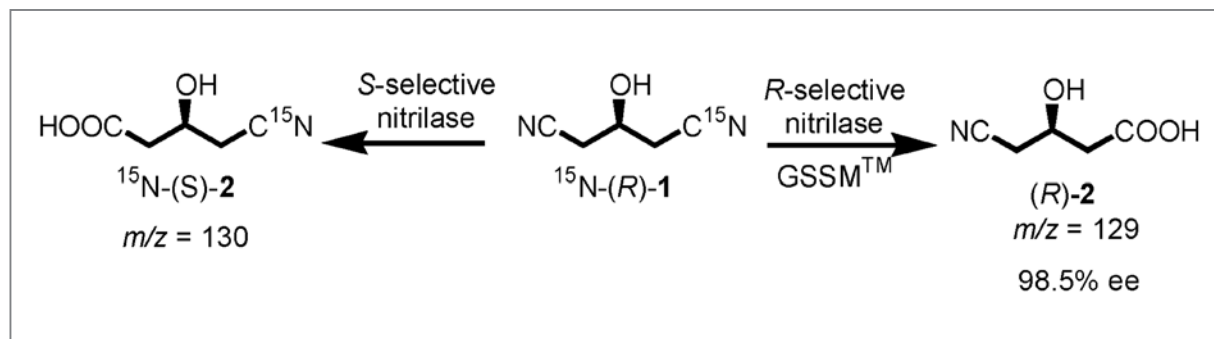


Figure 4. Gene site saturation mutagenesis (GSSM) technology applied for the directed evolution of a nitrilase enzyme

manufacturing processes. Codexis infrastructure is such that it allows scale up of optimized enzymes in a matter of weeks and full commercial production in three months. Their expertise in directed evolution, guided by proprietary software and bioinformatic systems, including Mosaic® and Sage™ directed evolution technology platforms, has resulted in the creation of ready-to-access biocatalyst libraries of enzymes with enhanced properties and features²⁷.

One Codexis team used this approach to create a two-step, three-enzyme process to replace a multistep chemical process for making ethyl (*R*)-4-cyano-3-hydroxybutyrate. This chemical, also known as hydroxynitrile, is the key chiral building block used to make Atorvastatin, the active ingredient in Pfizer's blockbuster cholesterol-lowering drug Lipitor²⁸. To achieve this, Codexis scientists modified sections in the enzyme halohydrin dehalogenase to optimize its structure for mediating one of the steps to make hydroxynitrile (*figure 5*).

3.3 Cephalosporins antibiotics and directed evolution

Cephalosporins, a class of β -lactam antibiotics, derived from the fungus *Acremonium*. Cephalosporins were discovered in 1945 and were first sold in 1964 (*figure 6*). Third-generation cephalosporins are broad-spectrum antimicrobial agents useful in a variety of clinical situations. Cefotaxime and ceftizoxime have the best gram-positive coverage of the third-generation agents. Ceftazidime and cefoperazone are the only third-generation drugs that provide antipseudomonal coverage. The third-generation cephalosporins except for cefoperazone penetrate

cerebrospinal fluid and are indicated for the treatment of bacterial meningitis. Their proven record of clinical efficacy, favorable pharmacokinetics, and low frequency of adverse effects make third-generation cephalosporins the preferred antibiotic in many clinical situations²⁹.

Studies on the biosynthetic pathways of Cephalosporin C and the structurally related Cephameycin C, revealed a common pathway including a step governed by deacetoxycephalosporin C synthase which catalyses the ring-expansion of penicillin N to deacetoxycephalosporin C. Because of the therapeutic importance of cephalosporins, this enzyme has been extensively studied for its ability to produce these antibiotics. Earlier studies showed that its substrate specificity was extremely narrow. But scientists with relentless research efforts optimized the *in vitro* enzyme assay conditions and were able to convert a wide range of penicillin substrates differing in their side chains. With advances in technology, the genes encoding this enzyme (2-oxoglutarate-dependent dioxygenase protein family) have been cloned and heterologously expressed for comparative analyses and mutagenesis studies. A high level of recombinant protein expression has also enabled crystallization of this enzyme for structure determination³⁰.

Semi-synthetic cephalosporin antibiotics belong to the top 10 of most sold drugs, and are produced from 7-aminodesacetoxycephalosporanic acid (7-ADCA) which is produced by a novel fermentation process. To complete the biosynthesis of 7-ADCA a highly active adiplyl acylase (enzyme) is needed for deacylation of the adiplyl derivative. The glutaryl acylase of *Pseudomonas* SY-77 was mutated in a first round by exploration mutagenesis and mutants were grown on an adiplyl substrate. The residues that are important to the adiplyl acylase activity were identified, and in a second round saturation mutagenesis of this selected stretch of residues yielded variants with a 3-fold increased catalytic efficiency. The substrate specificity of a dicarboxylic acid acylase was shifted towards adiplyl-7-ADCA by a two-step directed evolution strategy³¹.

Directed evolution has been used to improve the activity of cephalosporin acylases to produce these intermediates from adiplyl-7-ACA or cephalosporin

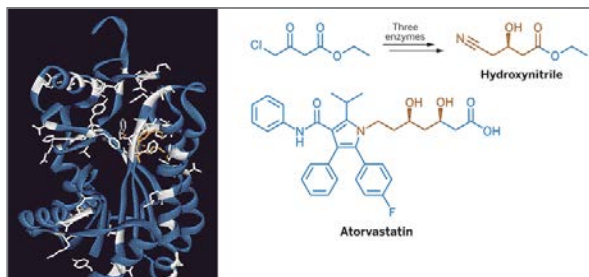


Figure 5. A. The ribbon structure of a halohydrin dehalogenase enzyme with sections modified by Codexis scientists in gray. B. Codexis' biocatalytic synthesis of Atorvastatin

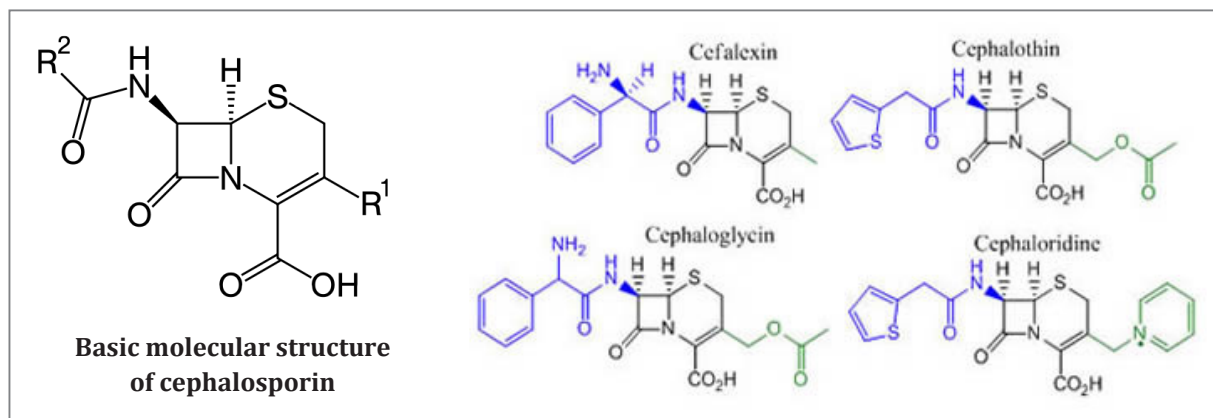


Figure 6. Cephalosporins antibiotics. Cephalosporins are indicated for treatment of infections caused by bacteria. First-generation cephalosporins were active predominantly against Gram-positive bacteria, and successive generations have increased activity against Gram-negative bacteria

C. Researchers using site-directed saturation mutagenesis and a selection system whereby the *E. coli* host is dependent on leucine liberated from derivatives of the cephalosporin side-chains, a mutant was found that increased the catalytic efficiency toward adipyl-7-ADCA by 36-fold³².

4. Polyketides for pharmaceuticals. Combinatorial biosynthesis

Polyketides are a class of natural secondary metabolites produced by certain living organisms. Many mycotoxins produced by fungi are polyketides. Polyketides are complex organic compounds that are characterized by more than two carbonyl groups, connected by single intervening carbon atoms and they are biologically highly active (figure 7). Many pharmaceuticals are derived from or inspired by polyketides. They constitute the basic chemical structure of various anticancer, antifungal, and anticholesteremic agents, antibiotics, parasitocides and immunomodulators. The most important antibiotics Doxycycline and Erythromycin are polyketide derivatives. The annual sales of pharmaceuticals derived from polyketides routinely reach 20 billion \$US³³.

Since the discovery of the antibiotic properties of polyketides (*i.e.*, streptomycin in 1950), the search for new compounds has led pharmaceutical companies to isolate tens of millions of antibiotic producing

strains though cultivable soil microorganisms remain the main source of antibiotics. However, traditional methods for searching new drugs, which involve the cultivation of microorganisms isolated from soil, are not so promising currently. As an alternative, an emerging method for obtaining biomolecules with new or improved pharmacological properties is the direct study of genetic material from complex environmental samples called Metagenomics. Metagenomics consists of extracting DNA directly from the environment and constructing a genomic library from this mixture. Then, these materials can be mining for genes of biotechnological interest, both for genetic homology as functional screening. This technique has been the source of many new bioactive compounds; among them we can cite psymberin, norcardamine, violacein and turbomycin A³⁴⁻³⁶.

Scientists at commercial pharmaceutical companies use a somewhat different approach to combinatorial biosynthesis. They isolate DNA from microbes that are difficult to cultivate and clone the DNA into *E. coli* and yeast. Researchers gathered microbial populations (in pools of as many as 1,000 species) from lichens, deep-sea thermal vents, and rain forest soil samples in a search for novel genes. Yeast and *E. coli* libraries become permanent archives containing the biosynthetic potential of entire microbial communities. Enzymes expressed from the archived genes can be used to produce libraries of novel compounds³⁷.

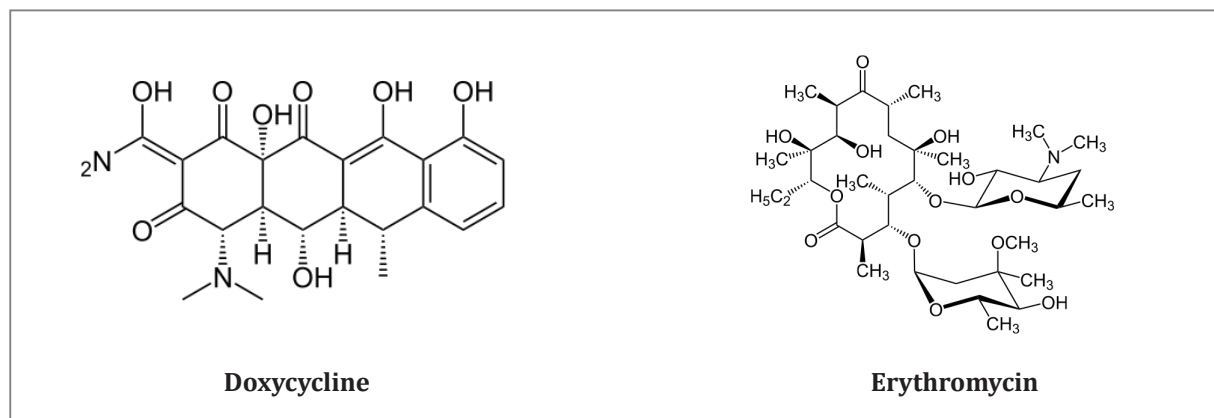


Figure 7. Chemical structures of polyketide-based antibiotics Doxycycline and Erythromycin

The biotechnological company EnzyMed, Inc. (Iowa City, IA, USA), used enzymes and microbes for the iterative derivatization of small-molecule lead compounds. The technology combined iterative enzymatic and microbial reactions with organic synthesis and screening expertise. This technological approach optimized lead compounds regardless of structural complexity. The technology used solution-phase reactions performed under mild conditions and provided controllable regio- and enantioselectivity in synthetic reaction for drugs³⁸.

The biosynthesis of the polyketide avermectin-analog doramectin (commercially sold by Pfizer as Dectomax) in a mutant *Streptomyces avermitilis* strain was hampered by the product specificity of one of the key intermediate enzymes, aveC, in the doramectin production pathway. Although the particular function of aveC was unknown, the occurrence of undesirable product CHC-B2 was found to be a result of its dual-product specificity. In an effort to improve the production ratio of doramectin: CHC-B2, site-specific and error-prone mutagenesis libraries were screened and resulted in several unrelated beneficial mutations that improved the production ratio up to 4-fold³⁹.

5. Directed evolution, combinatorial biosynthesis and drug synthesis

In the last decade scientists concentrated on devel-

oping effective enzymatic systems for a variety of synthetic medicinal purposes. Constructing novel biocatalytic systems that function in a robust and predictable manner requires better methods for discovering new functional molecules. Directed evolution has been proved a powerful complement to 'rational' engineering of enzymes.

Some enzymes require helpers to recognize a substrate or complete a reaction. These helpers include cofactors, coenzymes, and prosthetic groups. The expense of the cofactors in enzymes requires in situ cofactor regeneration for preparative applications. Researchers attempted to develop an enzymatic system based on phosphite dehydrogenase (PTDH) from *Pseudomonas stutzeri* to regenerate the reduced nicotinamide cofactors NADH and NADPH. They used directed evolution to address one of the main limitations with the wild-type PTDH enzyme and its low stability. After three rounds of random mutagenesis and high-throughput screening, 12 thermostabilizing amino acid substitutions were identified which were combined by site-directed mutagenesis, resulting in a mutant whose T_{50} is 20°C higher and half-life of thermal inactivation at 45°C is >7,000-fold greater than that of the parent PTDH. In addition, its catalytic efficiency is slightly higher than that of the parent PTDH. Various mechanisms of thermostabilization were identified using molecular modeling. The improved stability

and effectiveness of the final mutant were shown using the industrially important bioconversion of trimethylpyruvate to L-*tert*-leucine. The engineered PTDH will be useful in NAD(P)H regeneration for industrial biocatalysis⁴⁰.

Directed evolution was used for the improvement of the activity of enzymatic function. One example is chimeric Non-Ribosomal Peptide Synthetases (NRPSs). The experimental process involved various stages. At first, a heterologous A domain is swapped into an NRPS, typically resulting in a significant loss of synthetase activity. Then, a library of chimeric synthetase mutants is constructed in which the heterologous A domain has been diversified (for example, by error-prone PCR). The library is subjected to an *in vivo* screen for production of the unnatural nonribosomal peptide derivative. Clones showing improved production are characterized and subjected to further rounds of diversification and screening. Directed enzyme evolution and high-throughput screening are too expensive to supply stoichiometrically. Regeneration of the reduced cofactor form was accomplished by Woodyer et al. by linking an oxidoreductase reaction to phosphite dehydrogenase, an enzyme that oxidizes inert phosphite to phosphate with concomitant reduction of NAD(P) to NAD(P)H. However, the wild-type enzyme had relatively low activity. Through several rounds of random mutagenesis, the activity of the wild-type enzyme was improved by 6-fold⁴¹⁻⁴⁵.

Directed evolution and combinatorial biosynthesis in the last decade played an important role in overcoming problems for the synthesis of natural products analogs. The extraordinary structural complexity of natural products sometimes makes it challenging for traditional chemical synthesis, which usually involves multiple steps, harsh conditions, toxic organic solvents, and byproduct wastes. In contrast, combinatorial biosynthesis and directed evolution exploited substrate promiscuity and employs engineered enzymes and pathways to produce novel “unnatural” natural products, substantially expanding the struc-

tural diversity of natural products with potential pharmaceutical value. Thus, combinatorial biosynthesis provides an environmentally friendly way to produce natural product analogs. Efficient expression of the combinatorial biosynthetic pathway in genetically tractable heterologous hosts can increase the titer of the compound, eventually resulting in less expensive drugs. The major strategies for combinatorial biosynthesis are: a. precursor-directed biosynthesis; b. enzyme-level modification, which includes swapping of the entire domains, modules and subunits, site-specific mutagenesis, and directed evolution, and c. pathway-level recombination. Recent examples of combinatorial biosynthesis employing these strategies have been highlighted in a recent review⁴⁶.

6. Conclusions

In recent years, significant advances have been made in the field of biocatalysis and directed evolution methodology for the ‘green’ synthesis of pharmaceutical products. Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnology industries applied a series of efficient enzymatic catalysts which advanced the ‘green’ synthesis of complex molecules for drugs and chiral intermediates. Enzymes exhibit higher enantioselectivity, regioselectivity, substrate specificity, and stability. At the same time enzymes require mild conditions, while prompting higher reaction efficiency and product yields. In the last editions of specialized books on biocatalysis, written by internationally recognized scientists, there are at least 60 brand-name pharmaceuticals for a wide range of drug therapies and treatments^{47, 48}.

Another dimension of successful biocatalysis are methods employed by directed evolution. Directed evolution has been established as a powerful synthetic tool to bridge the present knowledge with innovative, efficient and stable enzymes. Directed evolution has found numerous applications at all levels of biological complexity and will likely continue to do so for many years to come^{49, 50}. □

Βιοκατάλυση και Κατευθυνόμενη Εξέλιξη στην Φαρμακευτική Βιομηχανία. Νέες Εξελίξεις σε "Πράσινες" Καταλυτικές Συνθέσεις Υψηλής Αξίας Φαρμακευτικών Ουσιών

Αθανάσιος Βαλαβανίδης

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου, 15784 Αθήνα

Περίληψη

Η φαρμακευτική βιομηχανία έχει εφαρμόσει εδώ και πολλά χρόνια τις αρχές της Πράσινης Χημείας (Green chemistry) για την ανάπτυξη εναλλακτικών συνθετικών τεχνικών στην σύνθεση φαρμακευτικών ουσιών και ενδιαμέσων ενώσεων. Η Βιοκατάλυση είναι πλέον καθιερωμένη οργανική συνθετική τεχνική για σημαντικό αριθμό γνωστών και εμπορικών φαρμάκων. Η ετερογενής καταλυτική τεχνική με τη χρήση μετάλλων και μοριακών καταλυτών αρχίζει να γίνεται η εξαίρεση. Τα ένζυμα έχουν καθιερωθεί ως παράγοντες μεγάλης σπουδαιότητας σε βιομηχανικές διεργασίες. Αν και τα ένζυμα είναι εξαιρετικοί καταλύτες δεν μπορούν να ανταποκριθούν στις απαιτητικές συνθήκες της βιομηχανικής παραγωγής. Η βελτιστοποίηση της καταλυτικής τους ικανότητας είναι απαραίτητη για να επιτευχθεί η κατάλληλη καταλυτική ικανότητα. Από τεχνική άποψη, αυτό μπορεί να επιτευχθεί μόνο με λογικό σχεδιασμό ο οποίος θα στοχεύει σε εξειδικευμένες τροποποιήσεις πρωτεϊνών με μεταλλαξογένεση σε προσδιορισμένα αμινοξέα, και εφαρμόζεται όταν υπάρχει

λεπτομερής γνώση για τις σχέσεις μεταξύ της δομής ενζύμων και βιοκαταλυτικών μηχανισμών. Η δεύτερη μεθοδολογική προσέγγιση είναι να προσδιορισθεί το ένζυμο για αποδοτική κατάλυση με τη μέθοδο της κατευθυνόμενης εξέλιξης. Η κατευθυνόμενης εξέλιξη (directed evolution) για την τροποποίηση ενζυμικών ιδιοτήτων είναι εξαιρετική εναλλακτική τεχνική. Προκαλούνται μεταλλάξεις (επιταχυνόμενη εξέλιξη) σε μύκητες, βακτήρια κ.λπ. και μετά τη χρήση της τεχνικής error prone PCR στα παραπάνω γονίδια, ακολουθεί σάρωση των βιβλιοθηκών από μεταλλαγμένους κλώνους. Ο έλεγχος μερικών χιλιάδων κλώνων δείχνει ότι ορισμένοι εμφανίζουν θερμοσταθερότητα ή υψηλή καταλυτική δράση σε σχέση με το ένζυμο αγρίου τύπου. Με πολυάριθμες εφαρμογές της κατευθυνόμενης εξέλιξης τα τελευταία χρόνια έχουν παραχθεί πρωτεϊνικά ένζυμα με εξαιρετικές καταλυτικές ιδιότητες για βιομηχανικές συνθέσεις φαρμάκων και χημικών ουσιών με τις αρχές της πράσινης χημείας. Η επισκόπηση αυτή περιλαμβάνει σημαντικό αριθμό πρωτότυπων ερευνών και βιομηχανικών εφαρμογών για την μεθοδολογία της βιοκατάλυσης και της κατευθυνόμενης εξέλιξης στην φαρμακευτική βιομηχανία. Επίσης περιλαμβάνονται οι πρόοδοι που έχουν επιτευχθεί στους τομείς αυτούς για την παραγωγή 'πράσινων' συνθέσεων σε μεγάλο αριθμό φαρμακευτικών ουσιών.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ: πράσινη χημεία, πράσινες συνθετικές μέθοδοι, βιοκατάλυση, κατευθυνόμενη εξέλιξη, μηχανική ενζύμων, νέες φαρμακευτικές ουσίες

*** Συγγραφέας υπεύθυνος για την αλληλογραφία:** Καθ. Αθ. Βαλαβανίδης,
E-mail : valavanidis@chem.uoa.gr

References

1. Dunn P.J., Wells A., Williams M.T. (Eds). *Green Chemistry in the Pharmaceutical Industry*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2010.
2. Cue B.W., Zhang J. Green process chemistry in the pharmaceutical industry. *Green Chem. Lett. Rev.* 2,193-211, 2009.

3. Ciriminna R., Pagliaro M. Green chemistry in the fine chemicals and pharmaceutical industries. *Org. Process Res. Dev.* 17, 1479–1484, 2013.
4. McLachlan M.J., Sullivan R.P., Zhang H. (2009) Directed enzyme evolution and high-throughput screening. Chapter 3, pp. 45–64. In: Tao J., Lin G.-Q. (Eds). *Biocatalysis for the Pharmaceutical Industry: Discovery, Development and Manufacturing*. John Wiley and Sons Asia, Singapore,
5. Tao J., Lin G.-Q., Liese A. (Eds). *Biocatalysis for the Pharmaceutical Industry: Discovery, Development and Manufacturing*. John Wiley and Sons, Asia, Singapore, 2008.
6. Sen S., Venkata Dasu V., Mandal B. Developments in directed evolution for improving enzyme functions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 143, 212–223, 2007.
7. Yuan L., Kurek I., English J., Keenan R. Laboratory-directed protein evolution. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 69, 373–392, 2005.
8. Lutz S. Beyond directed evolution - semi-rational protein engineering and design. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 734–743, 2010.
9. Roodveldt, C., Aharoni A., Tawfik D.S. Directed evolution of proteins for heterologous expression and stability. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 50–56, 2005.
10. Hibbert E.G., Baganz F., Hailes H.C., Ward J.M., Lye G.J., Woodley J.M., Dalby P.A. Directed evolution of biocatalytic processes. *Biomol. Engin.* 22, 11–19, 2005.
11. Bloom J.D., Arnold F.H. In the light of directed evolution: pathways of adaptive protein evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106(Suppl. 1), 9995–10000, 2009.
12. Turner N.J. Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis. *Trends Biotechnol.* 21, 474–478, 2003.
13. Sun Z., Wikmark Y., Backcall J.-E., Reetz M.T. New concepts for increasing the efficiency in directed evolution of stereoselective enzymes. *Chemistry* 22, 5046–5054, 2016.
14. Kumar S. Engineering cytochrome P450 biocatalysts for biotechnology, medicine, and bioremediation. *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.* 6, 115–131, 2010.
15. Julsing M.K., Cornelissen S., Bühler B., Schmid A. Heme-iron oxygenases: powerful industrial biocatalysts? *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12, 177–186, 2008.
16. Agudo R., Roiban G.-D., Reetz M.T. Achieving regio- and enantioselectivity of P450-catalyzed oxidative CH activation of small functionalized molecules by structure-guided directed evolution. *ChemBioChem.* 13, 1465–1473, 2012.
17. Huisman G.W., Collier S.J. On the development of new biocatalytic processes for practical pharmaceutical synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17, 284–292, 2013.
18. Cobb R.E., Sun N., Zhao H. Directed evolution as a powerful synthetic biology tool. *Methods* 60, 81–90, 2013.
19. Hansen K.B., Hsiao Y., Xu F., Rivera N., Clausen A., Kubryk M., Krska S., Rosner T., Simmons B., Balsells J., Ikemoto N., Sun Y., Spindler F., Malan C., Grabowski E.J., Armstrong J.D. 3rd. Highly efficient asymmetric synthesis of Sitagliptin. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 8798–8804, 2009.
20. Zhang W., Cue B.W. (Eds) (2012). *Green Techniques for Organic Synthesis and Medicinal Chemistry*, John Wiley & Sons, Chichester, W. Sussex.
21. Etayo P., Vidal-Ferran A. Rhodium-catalysed asymmetric hydrogenation as a valuable synthetic tool for the preparation of chiral drugs. *Chem. Soc. Rev.* 42, 728–754, 2013.
22. Savile C.K., Janey J.M., Mundorff E.C., Moore J.C., Jarvis W.R., Colbeck J.C., Krebber A., Fleitz F.J., Brands J., Devine P.N., Huisman G.W., Hughes G.J. Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to Sitagliptin manufacture. *Science* 329, 305–309, 2010.
23. Desai A.A. Sitagliptin Manufacture: A compelling tale of Green Chemistry, process intensification, and industrial asymmetric catalysis. *Angew. Chem.* 50, 1974–1976, 2011.
24. DeSantis G., Liu J., Clark D.P. Heine A., Wilson I.A., Wong C.H. Structure-based mutagenesis approaches toward expanding the substrate specificity of D-2-deoxyribose-5-phosphate aldolase. *Bioorg. Med. Chem.* 11, 43–52, 2003.
25. DeSantis G., Wong K., Farwell B. Chatman K., Zhu Z., Tomlinson G., Huang H., Tan X., Bibbs L., Chen P., Kretz K., Burk M.J. Creation of a productive, highly enantioselective nitrilase through gene site saturation mutagenesis (GSSM). *J. Am. Chem. Soc.* 125, 11476–11477, 2003.
26. Jennewein S., Schurmann M., Wolberg M., Hilker I,

- Luiten R., Wubbolts M., Mink D. Directed evolution of an industrial biocatalyst: 2-deoxyD-ribose 5-phosphate aldolase. *Biotechnol. J.* 1, 537–548, 2006.
27. Codexis. *CodeEvolver® Protein Engineering Technology* [<http://www.codexis.com/>] (accessed June 2016).
 28. Turner N.J. Directed evolution drives the next generation of biocatalysts. *Nature Chem. Biol.* 5, 567 – 573, 2009.
 29. Klein N.C., Cunha B.A. Third-generation cephalosporins. *Med. Clin. North Am.* 79, 705–719, 1995.
 30. Goo K.S., Chua C.S., Sim T.S. Directed evolution and rational approaches to improving *Streptomyces clavuligerus* deacetoxycephalosporin C synthase for cephalosporin production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 619–633, 2009.
 31. Sio C.F., Riemens A.M., van der Laan J.M., Verhaert R.M., Quax W.J. Directed evolution of a glutaryl acylase into an adipyl acylase. *Europ. J. Biochem.* 269, 4495–4504, 2002.
 32. Otten L.G., Sio C.F., Reis C.R., Koch G., Cool R.H., Quax W.J. A highly active adipyl-cephalosporin acylase obtained via rational randomization. *FEBS J.* 274, 5600–5610, 2007
 33. Weissman K.J. (2009) Introduction to polyketide biosynthesis. In: Hopwood D.A. (Ed). *Complex Enzymes in Microbial Natural Product Biosynthesis*, Part B: *Polyketides*, *Aminocoumarins* and *Carbohydrates* Methods in Enzymology. Academic Press, London, pp. 3–16
 34. Kim J.H., Simmons T.L., Brady S.F. Comprehensive natural products II, unlocking environmental DNA derived gene clusters using a metagenomics approach. *Chem. Biol.* 2, 455–474, 2010.
 35. Iqbal H.A., Feng Z., Brady S.F. Biocatalysts and small molecule products from metagenomic studies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 16, 109–116, 2012.
 36. Banik J.J., Brady S.F. Recent application of metagenomic approaches toward the discovery of antimicrobials and other bioactive small molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 603–609, 2010.
 37. Borchardt J.K. Combinatorial biosynthesis. Panning for pharmaceutical gold. *Mod. Drug Discovery* 2, 22–19, 1999.
 38. Michels P.C., Khmelnitsky Y.L., Dordick J.S., Clark D.S. Combinatorial biocatalysis: A natural approach to drug discovery. *Trends Biotechnol.* 16, 210–215, 1998.
 39. Stutzman-Engwall K., Conlon S., Fedechko R., Kaczmarek F., McArthur H., Krebber A., Chen Y., Minshull J., Raillard S.A., Gustafsson C. Engineering the *aveC* gene to enhance the ratio of doramectin to its CHC-B2 analogue produced in *Streptomyces avermitilis*. *Biotechnol. Bioeng.* 82, 359–369, 2003.
 40. Hohannes T.W., Woodyer R.D., Zhao H. Directed evolution of a thermostable phosphite dehydrogenase for NAD(P)H regeneration. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5728–5734, 2005.
 41. Woodyer R., van der Donk W., Zhao H. Relaxing the nicotinamide cofactor specificity of phosphite dehydrogenase by rational design. *Biochem.* 42, 11604–11614, 2003.
 42. Sen S., Dasu, V., Mandal, B. Developments in directed evolution for improving enzyme functions. *Appl. Biotechnol.* 143, 212–223, 2007.
 43. Yuan L., Kurek, I., English, J., Keenan R. Laboratory-directed protein evolution. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 69, 373–392, 2005.
 44. Roodveldt C., Aharoni A., Tawfik D.S. Directed evolution of proteins for heterologous expression and stability. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 50–56, 2005.
 45. Hibbert E.G., Baganz F., Hailes H.C., Ward J.M., Lye G.J., Woodley J.M., Dalby P.A. Directed evolution of biocatalytic processes. *Biomol. Eng.* 22, 11–19, 2005.
 46. Sun H., Lin Z., Zhao H., Ang E.L. Recent advances in combinatorial biosynthesis for drug discovery. *Drug Des. Devel. Ther.* 9, 823–833, 2015.
 47. Tao J., Lin G.-Q., Liese A. (Eds). (2009) *Biocatalysis for the Pharmaceutical Industry. Discovery, Development, and Manufacturing*. Wiley, N.Y.
 48. Patel R.N. (2016) Pharmaceutical intermediates by biocatalysis: from fundamental science to industrial applications in: *Applied Biocatalysis*, Hilterhaus L., Liese A., Kettling U., Antranikian G. (Eds) Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Chapter 16, pp. 367–404.
 49. Dougherty M.J., Arnold F.H. Directed evolution: new parts and optimized function. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 486–491, 2009.
 50. Currin A., Swainston N., Day P.J., Kell D.B. Synthetic biology for the directed evolution of protein biocatalysts: navigating sequence space intelligently. *Chem. Soc. Rev.* 44, 1172–1239, 2015.

Μεγα-Δεδομένα: Ο Νέος Ορίζοντας για την Καινοτομία στις Υπηρεσίες Υγείας και στη Φαρμακευτική Έρευνα. Οι Προκλήσεις στην Ανακάλυψη Νέων Φαρμάκων

Αννα Τσαντίλη - Κακουλίδου

Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α. Πανεπιστημιόπολις, Ζωγράφου, Αθήνα 157 71

Περίληψη

Τα mega δεδομένα, τα οποία χαρακτηρίζονται από μεγάλο όγκο, υψηλή ταχύτητα και υψηλή ποικιλομορφία, αναμένεται να αλλάξουν τον τρόπο ζωής μας τις επόμενες δεκαετίες, επιφέροντας επανάσταση στην καινοτομία την ανταγωνιστικότητα και την παραγωγικότητα σε πολλούς τομείς, μεταξύ άλλων και στον τομέα της υγείας και της φαρμακευτικής έρευνας. Η παρούσα σύντομη επισκόπηση εστιάζει στις προοπτικές που ανοίγονται όσον αφορά στη βελτίωση της φροντίδας υγείας, και

ιατρικών σφαλμάτων, την εξ αποστάσεως παρακολούθηση των ασθενών και την προαγωγή της εξατομικευμένης θεραπείας. Εκτενέστερη αναφορά γίνεται στη δημιουργία mega-δεδομένων υψηλής πολυπλοκότητας για χρήση στον πολυπαραγοντικό σχεδιασμό νέων υποψηφίων φαρμάκων και στη σημασία της 'θεραπείας' τους πριν την ανάλυση. Τέλος γίνεται μια συνοπτική αναφορά στα στατιστικά εργαλεία που εφαρμόζονται στην ανάλυση mega-δεδομένων.

KEYWORDS: Μεγα-δεδομένα, υπηρεσίες υγείας, σχεδιασμός φαρμάκων, θεραπεία βάσεων δεδομένων

1. Εισαγωγή

Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται μια ραγδαία αύξηση στην παραγωγή και καταγραφή δεδομένων σε όλους τους τομείς συμπεριλαμβανομένων των τομέων που σχετίζονται με την φαρμακευτική έρευνα και την υγεία γενικότερα. Μέθοδοι κωδικοποίησης των δεδομένων και η δυνατότητα ψηφιοποίησης της αποθήκευσης έχει δημιουργήσει σε πολύ μεγάλες βάσεις δεδομένων, οριζόμενες ως βάσεις μέγα δεδομένων. Υπάρχουν πολλοί ορισμοί των mega-δεδομένων. Σύμφωνα με τον ορισμό της Wikipedia "Big Data" εί-

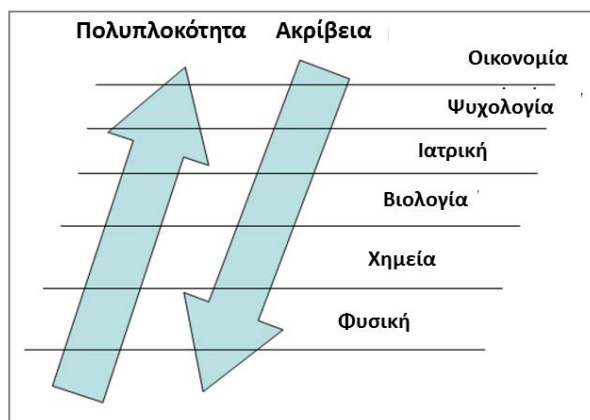
ναι ένας όρος που αφορά βάσεις δεδομένων που είναι τόσο μεγάλες ή τόσο πολύπλοκες που δεν επιτρέπουν την επεξεργασία τους για την άντληση πληροφοριών με τις συμβατικές μεθόδους¹. Ο όγκος των βάσεων mega-δεδομένων, εκφραζόμενος σε bytes αφορά σε τεράστιο αριθμό δεδομένων π.χ. σε εύρος terabytes (10^{12}), petabytes (10^{15}), hexabytes (10^{18}) ή και μεγαλύτερο. Η ταχύτητα, δηλαδή ο ρυθμός αύξησης του όγκου της πληροφορίας, η ποικιλία στο βαθμό διαφοροποίησης των δεδομένων και η μεταβλητότητα αποτελούν επίσης παράγοντες που χαρακτηρίζουν τα mega δεδομένα. Ένας δημοφιλής ορισμός των me-

Corresponding author: Αννα Τσαντίλη - Κακουλίδου, tsantili@pharm.uoa.gr

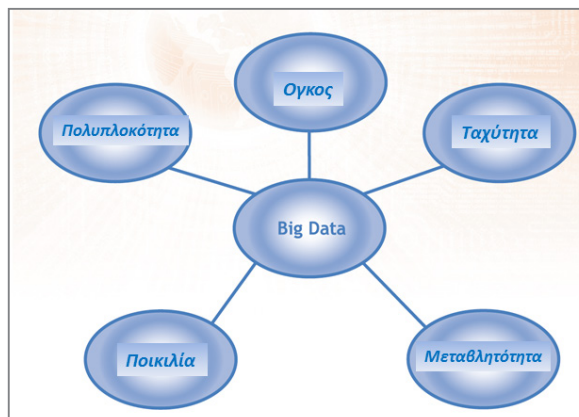
γα-δεδομένων που έχει προταθεί από τον Gartner βασίζεται στα “3V”: υψηλός όγκος (high volume), υψηλή ταχύτητα (high velocity) και υψηλή ποικιλομορφία (high variety) και στην απαίτηση καινοτόμων, αποτελεσματικών ως προς το κόστος τεχνικών για την επεξεργασία τους, με σκοπό την κατανόηση και τη λήψη αποφάσεων^{2,3}. Εναλλακτικά τα μεγάλα δεδομένα θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν από τον υψηλό βαθμό πολυπλοκότητας που οδηγεί τις συμβατικές μεθόδους επεξεργασίας σε αποτυχία.

Στο *σχήμα 1* συνοψίζονται οι παράγοντες που συμβάλουν στη δημιουργία βάσεων μεγάλων δεδομένων. Η ποικιλομορφία έχει περαιτέρω αναλυθεί σε ποικιλία, μεταβλητότητα και πολυπλοκότητα.

Η ανάλυση μεγάλων δεδομένων θεωρείται ότι αποτελεί τον νέο ορίζοντα για την καινοτομία την ανταγωνιστικότητα και την παραγωγικότητα και ήδη εφαρμόζεται σε πολλούς τομείς διαφορετικής πολυπλοκότητας από τη φυσική, τη χημεία, τη βιολογία, την ιατρική και την φροντίδα υγείας (evidence based medicine) μέχρι την οικονομία^{4,5}. Οι τομείς αυτοί αλληλοσυσχετίζονται ή οικοδομούνται επάλληλα, με την φυσική να βρίσκεται στη βάση του οικοδομήματος και την οικονομία στην κορυφή⁶ (*σχήμα 2*). Η αναγνώριση του ισχυρού δυναμικού της ανάλυσης μεγάλων δεδομένων οδήγησε το 2012 τον Πρόεδρο των Ηνωμένων Πολιτειών Obama να ανακοινώσει τη διάθεση > 200 M \$ για το πρόγραμμα Big Data Research and Development Initiative⁷, ενώ αντίστοιχα προγράμματα και στρατηγικές αναπτύσσονται και στην Ευρωπαϊκή Ένωση στα πλαίσια του Horizon 2020⁸.



Σχήμα 2. Τομείς αυξανόμενης πολυπλοκότητας, φθίνουσας ακρίβειας



Σχήμα 1. Χαρακτηριστικά μεγάλων δεδομένων

2. Εφαρμογές της Ανάλυσης μεγάλων δεδομένων στον Τομέα της Υγείας και της Φαρμακευτικής έρευνας

Η ανάλυση μεγάλων δεδομένων βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς τομείς που σχετίζονται με την υγεία και τη φαρμακευτική έρευνα. Αναφέρεται η σημασία της στο σύστημα φροντίδας της υγείας, στην κλινική έρευνα, στην ιατρική και φαρμακολογία συστημάτων, στην πρόβλεψη της τοξικότητας, στην ανάλυση ιατρικών δεδομένων, αλλά και στον σχεδιασμό και την ανακάλυψη νέων φαρμάκων^{9,10}.

2.1 Υπηρεσίες Υγείας

Η ανάλυση μεγάλων δεδομένων έχει προκαλέσει τομή στο σύστημα φροντίδας της υγείας με την αξιοποίηση αλληλοεπικαλυπτόμενων πρωτογενών δεξαμενών. Οι κυριότερες πηγές πρωτογενών δεξαμενών περιλαμβάνουν:

- 1) Κλινικά δεδομένα από παρόδους υγείας, πχ ηλεκτρονικά ιατρικά αρχεία, ιατρικές απεικονίσεις
- 2) δεδομένα φαρμακευτικής έρευνας και ανάπτυξης που προέρχονται από φαρμακευτικές εταιρείες και ακαδημαϊκά κέντρα και αφορούν σε πληροφορίες για το μηχανισμό δράσης, την πορεία του φαρμάκου στον οργανισμό, ανεπιθύμητες ενέργειες, τοξικότητα.
- 3) Αξιώσεις και δεδομένα κόστους από τους παρόχους και τις υπηρεσίες υγείας που περιγράφουν την αποτελεσματικότητα και το κόστος της θεραπείας και πολιτικές αποζημίωσης

4) Συμπεριφορά ασθενών και άλλων ενδιαφερομένων μερών εντός και εκτός του συστήματος υγείας.

Ένα επιτυχημένο παράδειγμα συμβολής των mega-δεδομένων στη φροντίδα υγείας αποτελεί η πρόβλεψη για την εξάπλωση της γρίπης το 2009, αναλύοντας δεδομένα από την Google¹¹. Η Google αποτελεί σήμερα τη μεγαλύτερη βάση mega-δεδομένων με δυνατότητα επεξεργασίας πληροφορίας μεγέθους περίπου 24 petabytes την ημέρα.

Η έρευνα McKinsey του ομώνυμου ιδιόκτητου το 2011 υποστηρίζει ότι η ανάλυση mega-δεδομένων στις ΗΠΑ θα μπορούσε να μειώσει το κόστος της υγείας περίπου κατά 300 δισεκατομμύρια \$ το χρόνο¹². Επιπλέον, η ανάλυση mega-δεδομένων επιτρέπει την παρακολούθηση ασθενών εξ αποστάσεως ενώ συμβάλλει σημαντικά στην μείωση των ιατρικών σφαλμάτων, δεδομένου ότι οι αποφάσεις λαμβάνονται με αλγορίθμους στη βάση έμπειρων συστημάτων¹³.

Η δύναμη των mega δεδομένων έχει ήδη εμπνεύσει ορισμένες εταιρείες να αναπτύξουν εφαρμογές μέσω κινητών τηλεφώνων για τη φροντίδα υγείας.

Για παράδειγμα, η εταιρεία Asthmapolis παρέχει βελτιωμένες υπηρεσίες στους πάσχοντες από άσθμα παρακολουθώντας με ενσωματωμένο GPS στις συσκευές εισπνοής πόσες φορές οι ασθενείς τις χρησιμοποιούν, εντοπίζοντας παράλληλα την τοποθεσία που βρίσκονται και την ώρα της ημέρας. Κατόπιν αναλυτικής επεξεργασίας οι ασθενείς λαμβάνουν εξατομικευμένες συμβουλές, με αξιοποίηση των λογισμικών iOS και Android. Σχετικές μελέτες έχουν δείξει ότι η εφαρμογή αυτή μείωσε τον αριθμό των μη ελεγχόμενων ασθματικών (που χρησιμοποιούν συσκευές εισπνοής) κατά 50%¹⁴. Η εταιρεία Gingerio παρέχει σε ασθενείς με διαβήτη εφαρμογή σε κινητό που δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της συμπεριφοράς τους σε συνεννόηση με τους θεράποντες¹⁵.

2.2 Φαρμακευτική έρευνα

Η ανάλυση mega-δεδομένων είναι δυνατόν να συμβάλει σε 5 άξονες της φαρμακευτικής έρευνας.

I. Σχεδιασμός νέων υποψηφίων φαρμάκων, μέσω μοντέλων πρόβλεψης

Η ανακάλυψη νέων φαρμάκων από το στάδιο της έρευνας ως την τελική έγκριση από τις ρυθμιστικές

αρχές απαιτεί σύνθετες, μακροχρόνιες και δαπανηρές διεργασίες^{16,17}. Η έμφαση σε μοντέλα πρόβλεψης της δράσης, των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, των ανεπιθύμητων ενεργειών και της τοξικότητας τις τελευταίες δεκαετίες στοχεύει στον έγκαιρο εντοπισμό των αποτυχιών και ως εκ τούτου μείωση του χρόνου και του κόστους στην ανακάλυψη νέων ασφαλέστερων φαρμάκων²¹. Εκτιμάται ότι τα μοντέλα πρόβλεψης είναι δυνατόν να μειώσουν κατά 3-5 έτη τον χρόνο που απαιτείται να μπει ένα φάρμακο στην αγορά και ο οποίος συνήθως φθάνει στα 13-15 έτη. Από την άλλη ο περιορισμός των ακριβών κλινικών δοκιμών στα υποψήφια φάρμακα με τις περισσότερες ευκαιρίες επιφέρει σημαντική μείωση του κόστους. Για την κατασκευή μοντέλων πρόβλεψης απαιτείται η αποτελεσματική στατιστική αξιοποίηση όσο το δυνατόν μεγαλύτερου όγκου προκλινικών και κλινικών δεδομένων. Η προσέγγιση αυτή έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ενός νέου επιστημονικού πεδίου, της φαρμακοπληροφορικής, η οποία στοχεύει στη διαχείριση όλων των διαθέσιμων πληροφοριών, από τη συγγένεια με τους υποδοχείς, ως τα φαρμακοκινητικά και τοξικολογικά αποτελέσματα²².

Επί πλέον έχει επίσης αναγνωριστεί η σημασία της οικονομικής θεώρησης στο σχεδιασμό φαρμάκων, δεδομένου ότι συχνά παίζει σημαντικό ρόλο για την πορεία των υποψηφίων φαρμάκων στην αγορά. Ως εκ τούτου πρόσφατα έχουν αρχίσει να διαμορφώνονται Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Οικονομίας (Quantitative Structure-Economics Relationships), βασισμένες σε ανάλυση mega-δεδομένων και οι οποίες συγχωνεύουν χημικές μεταβλητές με οικονομικούς δείκτες²³.

II. Πειραματικός σχεδιασμός των κλινικών δοκιμών

Η εφαρμογή στατιστικών εργαλείων και αλγορίθμων για πειραματικό σχεδιασμό συμβάλλει σε ορθότερο σχεδιασμό των κλινικών μελετών και στη στρατολόγηση των καταλληλότερων εθελοντών κατά τις κλινικές φάσεις της διαδικασίας έρευνας και ανάπτυξης. Προσομοιώσεις για την βελτιστοποίηση του εύρους των ενδείξεων για μια συγκεκριμένη δραστική ουσία καθώς και ο συνδυασμός προκλινικών και κλινικών δεδομένων με εμπορικές προβλέψεις και ιστορικό δεδομένων από ρυθμιστικές αρχές αυξάνουν τις πιθανότητες έγκρισης της νέας ένωσης²⁴.

III. Ανάλυση δεδομένων κλινικών δοκιμών - επαναστόχευση φαρμάκων

Η ανάλυση των δεδομένων κλινικών δοκιμών και αναφορών ασθενών, μεταξύ άλλων και μέσω της φαρμακοεπαγρύπνησης, είναι δυνατόν να συμβάλλει στον έγκαιρο εντοπισμό ανεπιθύμητων ενεργειών, ώστε τυχόν απόσυρση να γίνεται επίσης έγκαιρα. Είναι σαφές ότι απόσυρση ενός φαρμάκου φαρμάκων συχνά έχει δραματικά αποτελέσματα τόσο για τον πληθυσμό όσο και για την εταιρεία. Το 2004 η απόσυρση του αναλγητικού Vioxx κόστισε περίπου \$7 δισεκατομμύρια στη Merck, ενώ οδήγησε σε πολλούς αιφνίδιους θανάτους.

Από την άλλη, οι διαπιστούμενες ανεπιθύμητες ενέργειες είναι δυνατόν να ταυτιστούν με συγκεκριμένους υποδοχείς - στόχους και να οδηγήσουν στην επαναστόχευση γνωστών φαρμάκων²⁵.

IV. Εξατομικευμένη Θεραπεία

Η ανάλυση της βάσης mega-δεδομένων του γονιδιώματος αποτελεί πολλά υποσχόμενη τεχνική για την εξατομίκευση της θεραπείας. Ο στόχος αυτού του τομέα είναι η συσχέτιση μεταξύ γενετικών παραλλαγών, της προδιάθεσης για την ανάπτυξη συγκεκριμένων ασθενειών και των αποκρίσεων σε συγκεκριμένα φάρμακα και η αξιοποίηση αυτών των πληροφοριών κατά την ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Η εξατομικευμένη θεραπεία μπορεί να συμβάλει στην βελτίωση της φροντίδας υγείας με τρεις τρόπους:

- A)** Επιτρέπει την έγκαιρη διάγνωση της ασθένειας πριν ο ασθενής εμφανίσει συμπτώματα.
- B)** Βελτιώνει τις αποτελεσματικές θεραπείες δεδομένου ότι κατηγοριοποιούνται οι ασθενείς ως προς τη μοριακή τους 'υπογραφή' (έχει διαπιστωθεί ότι ασθενείς με την ίδια ασθένεια συχνά δεν αποκρίνονται το ίδιο σε μια θεραπεία λόγω γενετικής παραλλαγής)
- Γ)** Επιτρέπει τη ρύθμιση της δόσης σύμφωνα με το μοριακό προφίλ του ασθενή, ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι ανεπιθύμητες ενέργειες και να μεγιστοποιηθεί η απόκριση^{26,27}.

V. Ανάλυση του 'μοτίβου' των ασθενειών

Η ανάλυση του 'μοτίβου' των ασθενειών και των διαφαίνόμενων τάσεων επιτρέπει το σχεδιασμό για μελλοντικές απαιτήσεις και κόστη θεραπειών και οδηγεί

σε στρατηγικές αποφάσεις για επενδύσεις στην έρευνα και ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Η ανάλυση αυτή βοηθάει στην ορθότερη εστίαση της έρευνας καθώς και στην αναζήτηση των ανάλογων πόρων και εξοπλισμού.

3. Μεγα-Δεδομένα στη Φαρμακοχημεία και τον Σχεδιασμό φαρμάκων

Ο χημικός χώρος, ο χώρος δηλαδή που καλύπτει τις πιθανές μοριακές δομές και τις μοριακές τους ιδιότητες είναι τεράστιος. Ο φαρμακευτικός χώρος -υποσύνολο ή νησίδες μέσα στο χημικό χώρο μορίων που εμφανίζουν φαρμακοομοιοτητα- αν και μικρότερος εξακολουθεί επίσης να είναι πολύ μεγάλος. Τόσο ο χημικός όσο και ο φαρμακευτικός χώρος μπορούν να χωριστούν σε δυο κατηγορίες. Τους χώρους των υπαρκτών δομών (factual chemical space, FCS) όπου περιλαμβάνονται ενώσεις που έχουν συντεθεί και τους χώρους των εικονικών δομών (virtual CS, VCS) που αντιστοιχούν σε πιθανές δομές. Η υπηρεσία των Chemical Abstracts (Chemical Abstract Service (CAS) έχει καταχωρημένα 100 εκατομμύρια (10^8) εκ των οποίων τα 75 εκατομμύρια έχουν προστεθεί τα τελευταία 10 χρόνια. Κατά μέσο όρο η υπηρεσία CAS έχει καταγράψει μια ένωση κάθε 2,5 λεπτά τα τελευταία 50 χρόνια²⁸. Οι εκτιμήσεις για τον εικονικό χημικό χώρο ποικίλλουν με αριθμούς που κυμαίνονται από 10^{60} έως 10^{200} . Κατά συνέπεια ένα μικρό μόνο ποσοστό του εν δυνάμει μοριακού πληθυσμού έχει συντεθεί²⁹.

Για τη διαχείριση και αποθήκευση των χημικών δομών η κωδικοποίηση που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η γραφή SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) η οποία χρησιμοποιεί συμβολοσειρές ASCII (ASCII strings) για να αποτυπώσει τη διδιάστατη δομή σε μια γραμμή. Τα περισσότερα λογισμικά αναγνωρίζουν τον συντακτικό τύπο μέσω της κωδικοποίησης SMILES και έχουν τη δυνατότητα να τον μετατρέπουν σε τρισδιάστατη δομή.

Κάθε δομή συνοδεύεται από μοριακές ιδιότητες οι οποίες μετρούνται ή υπολογίζονται, διευρύνοντας τον αριθμό δεδομένων γύρω από αυτήν. Ας σημειωθεί ότι υπάρχουν λογισμικά που για κάθε μόριο υπολογίζουν πάνω από 4500 περιγραφικές μεταβλητές³⁰. Εξ άλλου για υπαρκτές δομές μια μέτρηση οδηγεί συχνά σε εκατοντάδες αποτελέσματα, εν δυνάμει αξιοποιήσιμα. Για παράδειγμα, ένα φάσμα NMR ή μάζας μπορεί να

Πίνακας 1. Βάσεις (μεγα)-δεδομένων που χρησιμοποιούνται στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων

Βάση	Όγκος δεδομένων	Ποικιλομορφία δεδομένων	Άλλα στοιχεία
Chemical Abstracts Service: CAS REGISTRY.... www.cas.org/content/casdatabases	Δεδομένα για 117 M μικρά μόρια	Χημικές δομές, χημικές ονομασίες, πειραματικά δεδομένα, υπολογιστικές τιμές.	Βιβλιογραφία από το 1800 FCS
Reaxys www.reaxys.com	Συγχωνευθείσες βάσεις δεδομένων 9 M (<i>Beilstein</i>), 2.5 M (<i>Gmellin</i>) & <i>Patents chemistry</i>	Χημικές και φυσικές ιδιότητες, μέθοδοι παρασκευής, χημική συμπεριφορά/ αντιδραστικότητα-σχεδιασμός σύνθεσης.	10 M χημικές αντιδράσεις και ιδιότητες. Βιβλιογραφία από το 1771. κυρίως FCS
ZINC zinc.docking.org	Πάνω από 2,7 M εμπορικά διαθέσιμες ενώσεις.	Δομές 3- D δραστηριότητα, τιμές IC ₅₀ (εάν διαθέσιμες).	Ελεύθερη βάση δεδομένων για ει-κονική διαλογή- υποβάσεις ανά-λογα με τον προμηθευτή ή άλλα κριτήρια π.χ. φίλτρα VCS και FCS
ChEMBL European Bioinformatics Institute www.ebi.ac.uk/chembl/	Μοριακοί στόχοι: 11.019; Ενώσεις ~ 2 M; Δεδομένα δραστηριότητας: 13.967.816	Δραστηριότητα και τιμές IC ₅₀ .	FCS
PubChem pubchem.ncbi.nlm.nih.gov	Ενώσεις 140 M Ελεγχθείσες 3 M Βιολογικά δεδομένα 226 M Βιολογικές μέθοδοι 1 M.	Βιοδραστηριότητα και φυσικο-χημικές ιδιότητες.	FCS Βιολογικοί έλεγχοι, βιοδραστικότητα, στόχοι, πατέντες
Therapeutic Target Database (TTD) http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/	2025 Γνωστοί στόχοι φαρμάκων, βιοχημικά μονοπάτια 17.816 φάρμακα		FCS
OCHEM https://ochem.eu/home/show.do	1.350.749 πειραματικές τιμές για 522 ιδιότητες (κυρίως ADMET συλλεχθείσες από 12473 πηγές		FCS

αναλυθεί ως προς το σύνολο των σημάτων.

Οι δομές, οι μοριακές ιδιότητες, τα δεδομένα βιολογικής δράσης, τα αποτελέσματα προκλινικών μελετών, τα αποτελέσματα κλινικών μελετών, αλλά και τα μετα-δεδομένα (δεδομένα που βασίζονται σε προηγούμενα δεδομένα, π.χ. δεδομένα μετα-αναλύσεων) καταγράφονται και αποθηκεύονται σε μεγάλες βάσεις δεδομένων. Στον **πίνακα 1** παρουσιάζονται ορισμένες βάσεις μεγα-δεδομένων που χρησιμοποιούνται ευρέως στη φαρμακοχημεία και τον σχεδιασμό φαρμάκων. Από αυτές ορισμένες είναι ελεύθερες στο διαδίκτυο, ενώ άλλες απαιτούν συνδρομή.

Ο όγκος FCS των χημικών/φαρμακευτικών βάσεων αυξάνεται δραματικά τα τελευταία χρόνια³¹. Επιπλέον, οι φαρμακευτικές εταιρείες συλλέγουν και καταγράφουν τα δικά τους δεδομένα. Στα πλαίσια της προσέγγισης 'open innovation' και υπό την πίεση οικονομικών δυσκολιών έχουν αρχίσει τα τελευταία

χρόνια φαρμακευτικές εταιρείες και ακαδημαϊκά κέντρα να συνεργάζονται και να μοιράζονται δεδομένα δημιουργώντας βάσεις δεδομένων που μπορούν να αξιοποιηθούν από όλους τους συμμετέχοντες ή είναι ελεύθερα προσβάσιμες στο κοινό^{32,33}. Συνολικά ο αριθμός των καταχωρήσεων FCS σε όλες τις σχετικές βάσεις κυμαίνεται σε εύρος δισεκατομμυρίου 10⁹, εντυπωσιακός κατ' αρχήν, σχετικά μικρός ωστόσο συγκριτικά με άλλους τομείς, όπου οι καταχωρήσεις συχνά μετρώνται σε exabytes, 10¹⁸³². (εξ ου και η παρένθεση στον τίτλο του πίνακα 1).

Ωστόσο όπως αναφέρθηκε κάθε ένωση συνοδεύεται από μοριακές ιδιότητες, περιγραφικές μεταβλητές, μοριακά αποτυπώματα, ενώ πολλά λογισμικά υπολογίζουν βιολογικές, φαρμακοκινητικές, τοξικολογικές ιδιότητες, με αποτέλεσμα ο αριθμός των δεδομένων αλλά και η πολυπλοκότητά τους να αυξάνει δραματικά, αποκτώντας τις προϋποθέσεις

που ορίζουν τα mega-δεδομένα¹⁻³. Ένας ιδιαίτερα μεγάλος αριθμός περιγραφικών μεταβλητών δημιουργείται με τον υπολογισμό Μοριακών Πεδίων Αλληλεπιδράσεων (Molecular Interaction Filed, MIF), τα οποία για κάθε ένωση αγγίζουν τον αριθμό 10^3 ή 10^4 . Έτσι, ενώ ένα τυπικό μοντέλο CoMFA (Comparable Molecular Field Analysis) αναλύει σειρά ενώσεων της τάξης 10^2 , η στατιστική επεξεργασία περιλαμβάνει πολύ μεγάλο όγκο δεδομένων³⁵. Μοντέλα 3D-7D QSAR επεξεργάζονται ακόμη μεγαλύτερο αριθμό δεδομένων, εξαρτώμενων και από τον υποδοχέα³⁶. Αντίστοιχα, η μοριακή δυναμική, η μοριακή προσομοίωση κλπ δημιουργούν μεγάλο όγκο δεδομένων προς ανάλυση. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι τα δεδομένα αυτά δεν είναι 'πραγματικά', αλλά υπολογίζονται *in silico* από την τριδιάστατη δομή των μορίων κατά τη διαδικασία της ανάλυσης και δεν αποθηκεύονται.

3.1 Θεραπεία των βάσεων (mega) - δεδομένων.

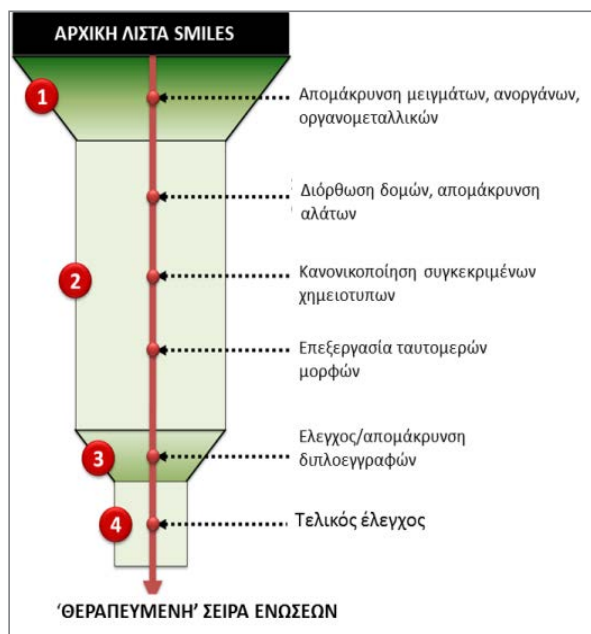
Data Curation

Ένα πρόβλημα που έχει απασχολήσει ιδιαίτερα τους ερευνητές είναι η αξιοπιστία των βάσεων mega-δεδομένων. Μια έρευνα 6 βάσεων δεδομένων (δύο ελεύθερων και 4 εμπορικών), χρησιμοποιώντας τεχνικές μοριακών αποτυπωμάτων, κατέδειξε ότι τα ποσοστά

των λαθών κυμαίνονται από 0,1 ως 3,4-10 % ανάλογα με τη βάση δεδομένων³⁷. Τα λάθη μπορεί να αφορούν τόσο στα χημικά όσο και τα βιολογικά δεδομένα. Στα χημικά δεδομένα λάθη μπορούν να αφορούν σε λάθη στην ίδια τη δομή, στην διαφορετική καταγραφή ταυτομερών, στην καταγραφή της ουδέτερης μορφής ενώ μπορεί να είναι άλας, στη μη σωστή ταυτοποίηση μειγμάτων κ.λπ. Στα βιολογικά δεδομένα ιδιαίτερη σημασία έχει η ομοιομορφία ως προς τις μονάδες και τη μορφή των αποτελεσμάτων, η σωστή πληροφορία ως προς τα πρωτόκολλα, ενώ έχουν παρατηρηθεί και λάθος τιμές είτε λόγω λανθασμένου πειράματος είτε από τυπογραφικό σφάλμα. Η παρουσία λαθών στις βάσεις δεδομένων αντανakλάται προφανώς στην αξιοπιστία των μοντέλων που εξάγονται. Ως εκ τούτου διαμορφώνεται η ανάγκη για 'θεραπεία' των βάσεων δεδομένων πριν την ανάλυσή τους^{38,39}. Στο σχήμα 3 παρουσιάζονται τα διαδοχικά βήματα θεραπείας βάσης δεδομένων.

4. Διαχείριση - επεξεργασία mega-δεδομένων στην φαρμακευτική έρευνα και στο σχεδιασμό φαρμάκων

Όπως ήδη αναφέρθηκε ο όγκος και η πολυπλοκότητα των βάσεων mega-δεδομένων δεν επιτρέπουν συνήθως την επεξεργασία με απλές στατιστικές τεχνικές. Εξ άλλου είναι σαφές ότι δεν είναι όλες οι πληροφορίες χρήσιμες ή σχετικές με το υπό μελέτη φαινόμενο. Η χημειοπληροφορική και η χημειομετρία παρέχουν στατιστικά εργαλεία τόσο για την οπτικοποίηση και κατηγοριοποίηση των δεδομένων όσο και για την εξαγωγή μοντέλων πρόβλεψης, αφού απορρίψουν τον 'θόρυβο' της πληροφορίας³¹. Η οπτικοποίηση και κατηγοριοποίηση αποτελεί σημαντικό βήμα και επιτυγχάνεται με την προβολή μεγάλων πληθυσμών ενώσεων σε χώρο μικρότερων διαστάσεων που επιτρέπει τον οπτικό έλεγχο. Αυτές οι τεχνικές βοηθούν στην εύρεση χημικών ενώσεων με καινοτόμο χημικό σκελετό και φυσικοχημικές ιδιότητες και επιτυγχάνουν το σχεδιασμό βιβλιοθηκών ενώσεων ή τη σύγκριση βιβλιοθηκών ενώσεων για τον εντοπισμό περιοχών στο χημικό χώρο που ανταποκρίνονται σε συγκεκριμένο φαρμακολογικό προφίλ^{40, 41}. Χαρακτηριστικές στατιστικές προσεγγίσεις αποτελούν η Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principle Component Analysis, PCA), Πα-



Σχήμα 3. Διαδικασία 'θεραπείας' βάσεων δεδομένων

Πίνακας 2. Στατιστικά εργαλεία, για μοντέλα πρόβλεψης ή κατηγοριοποίηση ευρέως χρησιμοποιούμενα στη φαρμακευτική έρευνα

	Γραμμική ανάλυση	Μη γραμμική ανάλυση	Μοντέλα πρόβλεψης	Κατηγοριοποίηση/ οπτικοποίηση
Πολλαπλή Γραμμική Ανάλυση Παλινδρόμησης (MLR)/ Γενετικοί Αλγόριθμοι	X		X	
Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Square/Projection latent Structures, PLS)	X		X	
Ανάλυση Παλινδρόμησης Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Regression, PCR)	X		X	
Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών Principal Component Analysis, PCA	X			X (μη επιβλεπόμενη)
PLS- Discriminant Analysis, PLS-DA	X			X (επιβλεπόμενη)
Generative Topographic Mapping, GTM		X		X (μη επιβλεπόμενη)
Γραμμική Διαχωριστική Ανάλυση (Linear Discriminant Analysis LDA)	X			X (επιβλεπόμενη)
Τεχνητά Νευρωνικά Δίκτυα (Artificial neural networks, ANN) Bayesian NN Associative NN		X	X	X (μη επιβλεπόμενη)
Μηχανές Διανυσμάτων Στήριξης (Support Vector Machine, SVM)		X	X	X (επιβλεπόμενη)
k-Nearest Neighbors		Μη παραμετρική	X	X (επιβλεπόμενη)
K-means		X	X	X (επιβλεπόμενη)
Δένδρα Αποφάσεων (Decision trees) Random forests		X	X	X (επιβλεπόμενη)
Δένδρα Κατηγοριοποίησης και Παλινδρόμησης (Classification and Regression Tree (CART)		X	X	X (επιβλεπόμενη)
Ensemble methods-Bagging-Boosting trees		X	X	X (επιβλεπόμενη)
Αποικίες μυρμηγκιών (Ant colonies)		X	X	

ραγωγική Τοπογραφική Χαρτογράφηση (Generative Topographic Mapping GTM), τα Τεχνητά Νευρωνικά Δίκτυα Kohonen (Kohonen networks) κ.λπ.⁴²

Για την εξαγωγή μοντέλων πρόβλεψης η κλασική πολλαπλή γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης μπορεί να εφαρμοστεί σε συνδυασμό Γενετικών ή Εξελικτικών Αλγορίθμων. Η Ανάλυση μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS), επέκταση της ανάλυσης κυρίων συνιστωσών (PCA) οδηγεί σε γραμμικά μοντέλα μέσω της μεθόδου των προβολών, ενώ εμφανίζει πλεονεκτήματα επιτρέποντας την ταυτόχρονη επεξεργασία περισσότερων αποκρίσεων για την εξαγωγή συ-

ναιετικού μοντέλου⁴³. Η ανάλυση PLS εφαρμόζεται στην επεξεργασία του μεγάλου όγκου των δεδομένων που δημιουργείται σε αναλύσεις 3D-XD QSAR^{35,36}. Τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα, οι μηχανές διανυσμάτων στήριξης, τα δένδρα αποφάσεων συγκαταλέγονται στις μηχανές εκμάθησης, που βρίσκονται σε συνεχή εξέλιξη και εφαρμόζονται τόσο για κατηγοριοποίηση όσο και για την εξαγωγή μη γραμμικών μοντέλων πρόβλεψης⁴². Για την επεξεργασία του μεγάλου όγκου των δεδομένων συχνά είναι απαραίτητο να προηγηθεί κανονικοποίηση ή μετατροπές (π.χ., κανονικοποίηση σε μοναδιαία διακύμανση-Unit Variance, Μετατροπές

Fourier, Μετασχηματισμοί Wavelet). Στον **πίνακα 2** συνοψίζονται οι κυριότερες τεχνικές που χρησιμοποιούνται στη φαρμακευτική έρευνα για την αξιοποίηση των μεγάλων δεδομένων. Η δυνατότητα πρόβλεψης της πολυφαρμακολογίας δηλ. της συγγένειας των ενώσεων με περισσότερες πρωτεΐνες στον οργανισμό ήδη στα πρώιμα στάδια σχεδιασμού είναι πολύτιμη διότι παρέχει πληροφορίες για την εκλεκτικότητα των ενώσεων και ενδεχόμενες ανεπιθύμητες ενέργειες ή την ενδεχόμενη συνέργεια τους σύμφωνα με την πολλαπλή στόχευση. Ο πολυπαραγοντικός σχεδιασμός επι πλέον χρειάζεται να συνδυάσει αποτελέσματα διαφορετικών διεργασιών, π.χ διαπερατότητα, μεταβολισμό, πρωτεϊνική σύνδεση με τη συγγένεια στους υποδοχείς. Η ανάλυση μεγάλων δεδομένων θα μπορούσε να στοχεύσει στην αξιοποίηση όλων των διαθέσιμων πληροφοριών στις βάσεις PubChem, ChEMBL κλπ για την κατασκευή ενός τέτοιου πολυπαραγοντικού μοντέλου για μια ολιστική πρόβλεψη της συμπεριφοράς υποψηφίων φαρμάκων. Ένα τέτοιο εγχείρημα προφανώς απαιτεί τεράστια υπολογιστική ισχύ και ακόμη πιο εξειδικευμένα και πέραν των προαναφερθέντων στατιστικά εργαλεία.

5. Συμπεράσματα

Τα μεγάλα δεδομένα αναμένεται να αλλάξουν τον τρόπο ζωής μας τις επόμενες δεκαετίες επιφέροντας επανάσταση στην καινοτομία την ανταγωνιστικότητα και την παραγωγικότητα σε πολλούς τομείς, μεταξύ άλλων και στον τομέα της υγείας και τη φαρμακευτική έρευνα. Η ελαχιστοποίηση των ιατρικών σφαλμάτων, η εξατομικευμένη θεραπεία, η παρακολούθηση των ασθενών εξ αποστάσεως, ο αποτελεσματικότερος σχεδιασμός των κλινικών μελετών αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα περιπτώσεων που επωφελούνται και υποστηρίζονται από την ανάλυση μεγάλων δεδομένων. Ειδικότερα στο σχεδιασμό των φαρμάκων μεγάλα δεδομένα συχνά δημιουργούνται από του υπολογισμό ιδιοτήτων και περιγραφικών μεταβλητών, την εμπλοκή περισσότερων διεργασιών και τη συγχώνευση διαφορετικής μορφής δεδομένων με αποτέλεσμα να παρατηρείται υψηλός βαθμός πολυπλοκότητας και να απαιτούνται εξειδικευμένες και αποτελεσματικές στατιστικές τεχνικές. □

Big Data: The New Horizon for Innovation in Health Care and Pharmaceutical Research. Challenges in Drug Discovery

Anna Tsantili-Kakoulidou
*Department of Pharmaceutical Chemistry,
Faculty of Pharmacy, National and Kapodistrian
University of Athens, Panepistimiopolis,
Zografou, Athens 157 01, Greece*

Summary

It is expected that Big Data, characterized by the three 'V'- high volume, high velocity, high variety- will change our lives in the next decades, be-

ing the next frontier for innovation, competition and productivity in many fields, including health and pharmaceutical research. The present review presents the new challenges triggered by data analysis for the improvement of health care, promoting minimization of medication errors, patients' distance follow up, personalized medicine. The creation of big data with high degree of complexity, to be used in multi-task drug discovery and the importance of their curation are discussed. Statistical tools used in Big Data Analysis are shortly presented.

Key words: Big Data; health care; drug discovery; data curation

References

1. Big Data. https://en.wikipedia.org/wiki/Big_data (10 November 2016).
2. Beyer M. A., Laney D. The importance of bigdata: A definition. Stamford, CT: Gartner, 2012
3. Laney D., 3-D data management: Controlling data volume, velocity, <http://blogs.gartner.com/doug-laney/files/2012/01/ad949-3D-Data-Management-Controlling-Data-Volume-Velocity-and-Variety.pdf>.
4. Groves P., Kayyali B., Knott D., van Kuiken S. (2013) The Big Data revolution in Health Care Center for US Health System Reform, Business Technology Office.
5. Cukier K., Mayer-Schönberger V. (2013) Big Data: A Revolution That Will Transform How We Live, Work, and Think. Business & Economics. New York.
6. Rosenblum, B., Kuttner, F. (2011) Quantum Enigma: Physics Encounters Consciousness. Oxford University Press.
7. Big Data Research and Development Initiative. https://www.whitehouse.gov/sites/default/files/microsites/ostp/big_data_press_release_final_2.pdf
8. <https://ec.europa.eu/digital-single-market/en/news/big-data-information-and-networking-days-horizon-2020-topics>.
9. Szlezák N., Evers M., Wang J., Pérez L. The role of big data and advanced analytics in drug discovery, development, and commercialization. *Clin Pharmacol Ther.* 95, 492-5, 2014.
10. Ekins S., Clark A.M., Joshua Swamidass S., Litterman N., Williams A.J. Bigger Data, Collaborative Tools and the Future of Predictive Drug Discovery. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 28, 997-1008, 2014.
11. Ginsberg J., Mohebbi M. H., Patel, R. S., Brammer L., Smolinski M.S., Brilliant L. Detecting influenza epidemics using search engine query data. *Nature* 457, 1012-1014, 2009.
12. Manyika J., Chui M., Brown B., Bughin J. DobbsR., Roxburgh C., Hung Byers A. (2011) McKinsey Global Institute, Big Data: The next frontier for innovation, competition and productivity.
13. Potts A.L., Barr F.E., Gregory D.F., Wright L., Patel N.R., "Computerized physician order entry and medication errors in a pediatric critical care unit," *Pediatrics* 113, 59-63, 2004.
14. Leiner S. Parkins D., Lastow O. Inhalation devices and patient interface: human factors. *AAPS J.* 17, 457-461, 2015.
15. <http://www.healthline.com/diabetesmine/new-ginger-io-app-connects-behavior-to-health#3>.
16. Paul S.M., Mytelka D.S., Dunwiddie C.T., Persinger C.C., Munos B.H., Lindborg S.R., Schacht A.L. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 203-214, 2010.
17. Nicolotti O., Gillet V.J., Fleming P.J., Green D.V. Multiobjective optimization in quantitative structure-activity relationships: Deriving accurate and interpretable QSARs. *J. Med. Chem.* 45, 5069-5080, 2002.
18. Kola I., Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 711-715, 2004.
19. Owens P.K., Raddad E., Miller J.W., Stille J.R., Olovich K.G., Smith N.V., Jones R.S., Scherer J.C. A decade of innovation in pharmaceutical R&D: the Chorus model. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 17-28, 2015.
20. Satyanarayanajois S.D. (2011) Drug design and discovery: Methods and protocols. Humana Press.
21. Tsantili-Kakoulidou A., Agrafiotis D.K. The 18th European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relationships. *Expert Opin. Drug Discov.* 6, 453-456, 2011.
22. Goldmann D., Montanari F., Richter L., Zdravil B., Ecker G.F. Exploiting open data: a new era in pharmacoinformatics. *Future Med. Chem.* 6, 503-514, 2014.
23. Polanski J., Kucia U., Duszkievicz R., Kurczyk A., Magdziarz T., Gasteiger J. Molecular descriptor data explain market prices of a large commercial chemical compound library. *Sci Rep.* 6, 28521, 2016.
24. Raghupathi W., Raghupathi V. Big data analytics in healthcare: promise and potential. *Health Inf. Sci. Syst.* 2, 3, 2014.
25. Naveed H., Hameed U.S., Harrus D., Bourguet W,

- Arold S.T., Gao X. An Integrated Structure- and System-Based Framework to Identify New Targets of Metabolites and Known Drugs. *Bioinformatics*, 31,3922-9, 2015.
26. Pulley J.M., Joshua C. Denny J.C., Peterson J.F., Bernard G.R., Vnencak-Jones C.L., Ramirez A.H., Delaney J.T., Bowton E., Brothers K., Johnson K., Crawford D.C., Schildcrout J., Masys D.R., Dilks H.H., Russell W.A., Wright Clayton E., Shultz E., Laposata M., McPherson J., Jim N. Jirjis J.N., Roden D.M. Operational implementation of prospective genotyping for personalized medicine: the design of the Vanderbilt PREDICT project. *Clin. Pharm. Ther.* 92, 87-95, 2012.
 27. Murdoch T.B., Detsky A.S., The inevitable application of big data to health care. *JAMA*, 309, 1351-1352, 2013.
 28. Chemical Abstracts Service. About CAS, CAS 100th Anniversary, CAS History: Milestones [Online]. <http://www.cas.org/aboutcas/cas100/annivhistory.html>.
 29. Drew K.L., Baiman H., Khwaounjoo P., Yu B., Reynisson J. Size estimation of chemical space: How big is it? *J. Pharm. Pharmacol.* 64,490-5, 2012..
 30. Todeschini R., Consonni V., (2009). *Molecular Descriptors for Chemoinformatics*, Volume 41 (2 Volume Set). John Wiley & Sons.
 31. Tetko I.V., Engkvist O., Koch U., Reymond J.-L., Chen H. BIGCHEM: Challenges and Opportunities for Big Data Analysis in Chemistry. *Mol. Inf.* 35, 615 – 621, 2016.
 32. Open Innovation Case Study: Pfizer's Centers for Therapeutic Innovation. <http://www.bioendeavor.net/CommonData/News-Files/Pfizer.pdf> (6 May 2016).
 33. Tetko I.V., Engkvist O., Chen H. Does 'Big Data' exist in medicinal chemistry, and if so, how can it be harnessed?, *Future Med. Chem.* (2016) 8(15), 1801-1806
 34. Mondal K. Design issues of Big Data parallelisms. *Adv. Intell. Syst. Comput.* 434, 209–217, 2016.
 35. Vrontaki E., Melagraki G., Afantitis A., Tsantili – Kakoulidou A., Mavromoustakos Th. 3D quantitative Structure - Activity Relationships (3D - qSAR): A short overview. *Pharmakeftiki*, 26, 126-137, 2015
 36. Polanski J. Receptor dependent multidimensional QSAR for modeling drug -receptor interactions. *Curr. Med. Chem.* 16, 3243-3257, 2009.
 37. Young D., Martin T., Venkatapathy R., Harten P. Are the Chemical Structures in Your QSAR Correct? *QSAR Comb. Sci.* 27, 1337-1345, 2008.
 38. Fourches D., Muratov E., Tropsha A. Trust, but Verify: On the Importance of Chemical Structure Curation in Cheminformatics and QSAR Modeling Research. *J. Chem. Inf. Model.* 50,1189–1204, 2010.
 39. Cherkasov A., Muratov E.N., Fourches D., Varnek A., Baskin I.I., Cronin M., Dearden J., Gramatica P., Martin Y.C., Todeschini R., Consonni V., Kuz'min V.E., Cramer R., Benigni R., Yang C., Rathman J., Terfloth L., Gasteiger J., Richard A., Tropsha A. QSAR modeling: where have you been? Where are you going to? *J. Med. Chem.* 57, 4977-5010, 2014.
 40. Vainio M.J., Kogej T., Raubacher F. Automated recycling of chemistry for virtual screening and library design. *J. Chem. Inf. Model.* 52,1777-1786, 2012.
 41. Lessel U., Wellenzohn B., Lilienthal M., Claussen H. Searching fragment spaces with feature trees. *J. Chem. Inf. Model.* 49, 270-279, 2009.
 42. Lima A.N., Philot E.A., Trossini G.H.G., Scott L.P.B., Maltarollo V.G., Honorio K.M., Use of machine learning approaches for novel drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 11, 225-239, 2016.
 43. Vallianatou T., Lambrinidis G., Giaginis C., Mikros E., Tsantili-Kakoulidou A. Analysis of PPAR- α/γ Activity by Combining 2-D QSAR and Molecular Simulation. *Mol. Inform.* 32, 431-445, 2013.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ
ΕΤΑΙΡΕΙΑ

Νέα από την Ελληνική Φαρμακευτική Εταιρεία



Στην Φωτογραφία εμφανίζονται όλοι οι συμμετέχοντες στο council meeting πρόεδροι των Ευρωπαϊκών επιστημονικών εταιρειών

Η Ελληνική Φαρμακευτική Εταιρεία (ΕΦΕ) συμμετέχει ενεργά στις δραστηριότητες της **European Federation of Pharmaceutical Sciences (EUFEPS)**. Τον Δεκέμβριο 2016 έλαβε χώρα στο Leiden (Ολλανδία) η συνάντηση του Council της EUFEPS στις εργασίες του οποίου μετείχε από πλευράς ΕΦΕ ο Πρόεδρος της Καθηγητής **Κώστας Δεμέτζος**. Στο Council συζητήθηκαν θέματα που αφορούσαν τις διαδικασίες για την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα κυρίως των επιστημονικών δικτύων (networks), με προτάσεις για την συμμετοχή περισσότερων εταίρων τόσο απο την βιομηχανία όσο και σε ατομικό επίπεδο. Επίσης συ-

ζητήθηκε σε μεγάλο βαθμό η «γέφυρα» η οποία αναπτύσσεται ανάμεσα σε EUFEPS και AAPS (American Association of Pharmaceutical Sciences) με στόχο την εναρμόνηση των επιστημονικών δραστηριοτήτων των μεγάλων αυτών οργανισμών. Επίσης, με πρόταση της Γερμανίας, αποφασίσθηκε η μεταφορά της γραμματείας της EUFEPS στο Βερολίνο με προσωπικό το οποίο διαθέτει χωρίς οικονομική επιβάρυνση η Γερμανική Φαρμακευτική Εταιρεία. Τέλος, συζητήθηκαν θέματα και λεπτομέρειες της συμμετοχής των Ευρωπαϊκών χωρών στο παγκόσμιο συνέδριο της FIP τον Μάιο στην Στοκχόλμη το 2017.

Δημοσίευση position paper στο European Journal of Pharmaceutical Sciences Post position paper in the European Journal of Pharmaceutical Sciences

Επίσης τα μέλη του Δ.Σ. της ΕΦΕ δημοσίευσαν τα αποτελέσματα ερωτηματολογίου σχετικά με τη διαβίωση μάθηση και τη συνεχιζόμενη επαγγελματική διαμόρφωση των φαρμακοποιών στο επιστημονικό

περιοδικό **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, επίσημο όργανο της EUFEPS. Ο τίτλος της δημοσίευσης, οι συγγραφείς και η περίληψη φαίνονται στην ακόλουθη εικόνα.



Summary

The purpose of this study was to examine pharmacists' attitudes, behaviors, and preferences towards continuous professional development (CPD) in Greece. The Hellenic Pharmaceutical Society (HPS) in Greece developed a questionnaire that was available online for the Greek pharmacists from all working fields to fill out. All responses were included in the data collection and survey results were compiled into Excel software spreadsheets for analysis. Pharmacists in Greece seem to understand the need of CPD in their profession and are willing to undertake courses to enhance CPO opportunities: All of the respondents agreed on the need to strengthen

their knowledge and 57% of them indicated that they would be willing to participate in a complete program of high level interactive training that leads to certification after suitable examinations and, 31% were willing to participate in interactive training and 12% were willing to participate in a basic training. Almost half of the respondents were willing to spend more than 8 hours per month on their continuing education indicating that Greek pharmacists are willing to adopt a complete CE system. This study provides and assesses important baseline data on pharmacists and CPD in Greece to provide guidance to future efforts towards development of a CPD program.

ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ



Ιστορία της Φαρμακευτικής [ηλεκτρονικό βιβλίο]

Σκαλτσά, Ε., 2015. Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/5095>
ISBN: 978-960-603-333-9 ID Ευδόξου: 59303494

Περιλαμβάνει τα ακόλουθα κεφάλαια:

1. Θρησκευτική περίοδος
2. Τα φάρμακα στην αρχαία Ελλάδα
3. Ρωμαϊκή ή ελληνο-ρωμαϊκή περίοδος (146 μ.Χ.-395 μ.Χ.)
4. Η φαρμακευτική στο Βυζάντιο
5. Η φαρμακευτική στον αραβικό κόσμο
6. Η Φαρμακευτική κατά τον Μεσαίωνα
7. Η Φαρμακευτική κατά την Αναγέννηση
8. Η Φαρμακευτική μετά την ίδρυση του Ελληνικού Κράτους
9. Σύγχρονα φάρμακα: η ανακάλυψή τους

Στο σύγγραμμα περιγράφεται η εξελικτική πορεία των φαρμάκων από αρχαιοτάτων χρόνων έως σήμερα. Ο άξονας επί του οποίου σταδιακά διαμορφώνεται η Ιστορία της Φαρμακευτικής ακολουθεί τις εξής περιόδους:

1.Θρησκευτική περίοδος:

α) Θεραπευτική πρωτογόνων β) Αρχαίων ανατολικών λαών

2.Φιλοσοφική περίοδος:

α) Τα φάρμακα στην αρχαία Ελλάδα, β) η διάδοση και η εξέλιξή τους στην Ρωμαϊκή εποχή γ) στο Βυζάντιο.

Γίνεται επίσης αναφορά σε σύγχρονα φυτικά φάρμακα και σε ιστορικά & εθνοφαρμακολογικά δεδομένα.

3.Πειραματική περίοδος:

α) Φαρμακευτική Αράβων β) Αλχημιστές γ) Ιατροχημικοί δ) φυτικές δρόγες, που εισήχθησαν στην Ευρώπη από τους Θαλασσοπόρους

4.Επιστημονική περίοδος (19ος αιώνας -σήμερα):

Αναφέρεται η απομόνωση φαρμακευτικών ουσιών από φυτά, η ανάπτυξη της συνθετικής Φαρμακευτικής Χημείας (πχ. συνθετικά αναλγητικά, αντιισταμινικά, χρωστικές κλπ), η βιομηχανική παραγωγή φαρμάκων. Επίσης περιγράφεται η ανακάλυψη των αντιβιοτικών, αντικαρκινικών (φυσικών, ημισυνθετικών, συνθετικών), ορμονών, ενζύμων, βιταμινών. Παράλληλα περιγράφονται συνοπτικά τα σημαντικά επιτεύγματα και συναφών επιστημών, όπως Βιολογίας, Χημείας κ.ά., τα οποία επηρέασαν την εξέλιξη της Φαρμακευτικής επιστήμης.

Ακόμη στο σύγγραμμα αναφέρονται οι επίσημες και ανεπίσημες Φαρμακοποιίες του Ελληνικού Κράτους και επισημαίνονται οι αλλαγές σε κάθε έκδοση με βάση την εξέλιξη της Φαρμακευτικής επιστήμης.

Γίνεται αναφορά στην ίδρυση των Φαρμακευτικών Σχολών και ιδιαιτέρως του ΕΚΠΑ, που ήταν η πρώτη που ιδρύθηκε και στις αλλαγές του προγράμματος σπουδών

Τέλος αναφέρεται η ίδρυση των πρώτων φαρμακείων στην Ελλάδα.

.....

ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ | MEETINGS

9 - 12 OCTOBER 2016

VIENNA, AUSTRIA

16th International Symposium on Preparative and Industrial Chromatography and Allied Techniques

www.spica2016.org

20 - 23 OCTOBER 2016

SPARTA, GREECE

2nd World Congress 'Genetics, Geriatrics and Neurodegenerative Diseases Research'

<http://www.genedis.eu/>

18 NOVEMBER 2016

BUDAPEST, HUNGARY

VI Meeting of the Paul Ehrlich Euro-PhD Network

<http://phdcongress.com>

<http://www.pehrlichmedchem.eu>

24 - 25 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2016

ΑΘΗΝΑ

Διημερίδα Ελληνικής Φαρμακευτικής Εταιρείας

«Η βιβλιογραφία ως “πολυδύναμο εργαλείο” για την επιστήμη»

www.effe.org.gr/

11 - 12 FEBRUARY 2017

ΑΘΗΝΑ

Επιστημονική Ημερίδα Ελληνικής Φαρμακευτικής Εταιρείας

Zappeion Conference and Exhibition Center

18 - 19 ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΥ 2017

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ

3ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φαρμακευτικών Τμημάτων

Αίθουσα Τελετών του ΑΠΘ

www.pharma.edu.gr

ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ | MEETINGS

18 - 19 FEBRUARY 2017**ΑΘΗΝΑ**

1^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φαρμακευτικής Φροντίδας
Ελληνική Φαρμακευτική Εταιρεία

Εκθεσιακό Κέντρο Metropolitan Expo, Αθήνα

1 - 3 JUNE 2017**THESSALONIKI, GREECE**

17th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry (HSMC-17)

www.hsmc.gr

11 - 14 JUNE 2017**COPENHAGEN, DENMARK**

1st RSC Anglo-Nordic Medicinal Chemistry Symposium

<http://www.rsc.org/events/detail/23370/1st-rsc-anglo-nordic-medicinal-chemistry-symposium>

25 - 28 JUNE 2017**DUBROVNIK, CROATIA**

Joint Meeting on Medicinal Chemistry

<http://www.jmmc2017.hr/>

31 AUGUST - 1 SEPTEMBER 2017**VIENNA, AUSTRIA**

EFMC-YMCS 2017 - 4th EFMC Young Medicinal Chemist Symposium

[EFMC-YMCS website](#)

5 - 8 SEPTEMBER 2017**BRATISLAVA, SLOVAKIA**

46th EuroCongress on Drug Synthesis and Analysis

<https://sites.google.com/site/cfph2017>




abasaglar®
insulin glargine injection
(rDNA origin) 100 units/mL

Ας μιλήσουμε για το πώς θα βοηθήσουμε τους ασθενείς σας να αισθανθούν καλύτερα σχετικά με την έναρξη βασικής ινσουλίνης



Η ABASAGLAR ενδείκνυται για τη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη σε ενήλικες, εφήβους και παιδιά ηλικίας 2 ετών και άνω.¹

1. Π.Χ.Π. ABASAGLAR 100 μονάδες/ml KwikPen

Το φάρμακο αυτό τελεί υπό συμπληρωματική παρακολούθηση. Αυτό θα επιτρέψει τον ταχύ προσδιορισμό νέων πληροφοριών ασφαλείας. Ζητείται από τους επαγγελματίες του τομέα της υγείας να ενημερώσουν τους ασθενείς σχετικά με την αντανάκλαση των αναμενόμενων ανεπιθύμητων ενεργειών. **ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ:** ABASAGLAR 100 μονάδες/ml ενέσιμο διάλυμα σε προγεμισμένο πένα. **ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΙΤΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ:** Κάθε ml περιέχει 100 μονάδες ινσουλίνης glargine* (αντιστοιχούν σε 3,64 mg). Κάθε πένα περιέχει 3 ml ενέσιμο διάλυμα, που αντιστοιχούν σε 300 μονάδες ινσουλίνης. Η ινσουλίνη glargine παράγεται με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA στην *Escherichia coli*. **Θεραπευτικές ενδείξεις:** Θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη σε ενήλικες, εφήβους και παιδιά ηλικίας 2 ετών και άνω. **Δοσολογία και τρόπος χορήγησης:** Η ABASAGLAR περιέχει ινσουλίνη glargine, ένα ανάλογο ινσουλίνης με παρατεταμένη διάρκεια δράσης. Πρέπει να χορηγείται εφάπαξ ημερησίως οποιαδήποτε ώρα, αλλά κατά την ίδια ώρα κάθε ημέρα. Το δοσολογικό σχήμα (δόση και χρόνος) της ABASAGLAR θα πρέπει να εξοικειωθεί. Σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, η ABASAGLAR μπορεί επίσης να χορηγηθεί με από του στόματος αντιαβητικά φαρμακευτικά προϊόντα. Η δραστικότητα αυτού του φαρμακευτικού προϊόντος δίδεται σε μονάδες. Οι συγκεκριμένες μονάδες αναφέρονται αποκλειστικά στην ινσουλίνη glargine και δεν είναι ίδιες με τις διεθνείς Μονάδες [IU] ή με τις μονάδες που χρησιμοποιούνται για να εκφράσουν τη δραστικότητα άλλων αναλόγων ινσουλινών. **Ειδικές κατηγορίες πληθυσμού:** στους ηλικιωμένους με προδεδειγμένη τη νεφρική λειτουργία μπορεί να οδηγήσει σε σταθερή μείωση των αναγκών σε ινσουλίνη. Σε ασθενείς με ηπατική δυσλειτουργία, οι ανάγκες σε ινσουλίνη μπορεί να ελαττωθούν εξαιτίας της μειωμένης ικανότητας να διασπαστεί και του ελαττωμένου μεταβολισμού της ινσουλίνης. Η ασφαλεία και η αποτελεσματικότητα της ινσουλίνης glargine έχουν τεκμηριωθεί σε εφήβους και παιδιά ηλικίας 2 ετών και μεγαλύτερα αλλά δεν έχει τεκμηριωθεί σε παιδιά ηλικίας μικρότερης των 2 ετών. **Μετάβαση από άλλες ινσουλίνες στην ABASAGLAR:** κατά την αλλαγή από μερική ή μακράς διάρκειας δράσης ινσουλίνη σε ABASAGLAR, μπορεί να απαιτηθεί αλλαγή στη δόση της βασικής ινσουλίνης και της συγκαταρκτικής αντιαβητικής θεραπείας. Προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος υπογλυκαιμίας, οι ασθενείς οι οποίοι αλλάζουν από ινσουλίνη NPH χορηγούμενη δύο φορές την ημέρα σε ABASAGLAR χορηγούμενη εφάπαξ ημερησίως, θα πρέπει κατά τη διάρκεια των πρώτων εβδομάδων να ελαττώσουν την ημερήσια δόση της βασικής ινσουλίνης κατά 20-30%. Κατά τις πρώτες εβδομάδες η μείωση πρέπει, τουλάχιστον μερικώς, να εξισορροπείται από κάποια αύξηση της ινσουλίνης την ώρα του γεύματος. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα το δοσολογικό σχήμα θα πρέπει να προσαρμόζεται σταδιακά. Όπως και με άλλα ανάλογα ινσουλινών, οι ασθενείς με υψηλές δόσεις ινσουλίνης εξαιτίας των αντισωμάτων στην ανθρώπινη ινσουλίνη μπορεί να παρουσιάσουν βελτιωμένη ανταπόκριση στην ινσουλίνη με την ABASAGLAR. **Μετάβαση από ινσουλίνη glargine 300 μονάδες/ml στην ABASAGLAR:** Η ABASAGLAR και η Tiojevo (ινσουλίνη glargine 300 μονάδες/ml) δεν είναι άμεσα εναλλάξιμες. Προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος υπογλυκαιμίας, οι ασθενείς, οι οποίοι αλλάζουν το σχήμα της βασικής ινσουλίνης τους από ένα σχήμα ινσουλίνης glargine 300 μονάδες/ml χορηγούμενο από ημερησίως, θα πρέπει να μειώσουν τη δόση τους περίπου κατά 20%. **Τρόπος χορήγησης:** Η ABASAGLAR χορηγείται υποδορίως και δεν θα πρέπει να χορηγείται ενδοφλέβια. Δεν υπάρχουν κλινικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα σακχάρου ή ινσουλίνης στον ορό μετά τη χορήγηση της ινσουλίνης glargine στην καυκάσια, χινοασιά ή δελταϊδική περιοχή. Η ABASAGLAR δεν πρέπει να αναμιγνύεται με καμία άλλη ινσουλίνη ούτε να διαλύεται. **Ανεπιθύμητες:** υπεραισθησία στην δραστική ουσία ή σε κάποιο από τα έκδοχα. **Ειδικές προειδοποιήσεις και προφυλάξεις κατά τη χρήση:** Η ABASAGLAR δεν είναι η ινσουλίνη επιλογής για τη θεραπεία της διαβητικής κετοξέωσης. Στην περίπτωση που η ρύθμιση του σακχάρου είναι ανεπαρκής ή υπάρχει τάση για επείσο υπογλυκαιμίας ή υπογλυκαιμίας θα πρέπει να ληφθούν υπόψη η συμμόρφωση του ασθενούς στο καθορισμένο θεραπευτικό σχήμα, οι θέσεις των ενέσεων και η σωστή τεχνική τους καθώς και άλλα αίτια ανεπιθύμητων παραγόντων. **Υπογλυκαιμία:** επειδή με την ινσουλίνη glargine ο εφραίσιμος της βασικής ινσουλίνης είναι πιο σταθερός, μπορεί να αναμένεται λιγότερο νυχτερινή υπογλυκαιμία αλλά περισσότερο πρωινή υπογλυκαιμία. Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή και συνιστάται εντατικότερη παρακολούθηση του σακχάρου του αίματος σε ασθενείς στους οποίους το υπογλυκαιμικό επεισόδιο μπορεί να ακολουθείται με πιο σοβαρές κλινικές καταστάσεις. Η παρατεταμένη δράση της υποδόριας ινσουλίνης glargine μπορεί να καθυστερήσει την ανίχνευση από υπογλυκαιμία. **Σύνδυγματα:** Η ABASAGLAR με **παιγνίζονται**, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις καρδιακής ανεπάρκειας όταν συγκαταρκτική η **παιγνίζονται** με ινσουλίνη, ειδικότερα σε ασθενείς με παραγόντες κινδύνου για εμφάνιση καρδιακής ανεπάρκειας. Αυτό πρέπει να ληφθεί υπόψη στην περίπτωση συνδυασμένης θεραπείας **παιγνίζονται** με ABASAGLAR. Εφόσον χρησιμοποιείται ο συνδυασμός, οι ασθενείς πρέπει να παρακολουθούνται για σημεία και συμπτώματα καρδιακής ανεπάρκειας, αύξηση βάρους και οίδημα. Η **παιγνίζονται** πρέπει να διακοπεί στην περίπτωση που παρουσιαστεί επείγουσα επένδυση των καρδιακών συμπτωμάτων. **Έκδοχα:** περιέχει λιγότερο από 1 mmol νατρίου (23 mg) ανά δόση, δηλ. είναι υποοσμωτικό «ελεύθερο νατρίου». **Αλληλεπιδράσεις με άλλα φαρμακευτικά προϊόντα και άλλες μορφές αλληλεπιδράσεων:** ένας αριθμός ουσιών επηρεάζουν το μεταβολισμό της γλυκόζης και μπορεί να απαιτούν αναπροσαρμογή της δόσης της ινσουλίνης glargine. Για τη χορήγηση άλλων φαρμακευτικών προϊόντων ταυτόχρονα με την ABASAGLAR 100 μονάδες/ml KwikPen θα πρέπει να συμβουλευτείτε τον γιατρό. **Γονιμότητα, κύηση και γαλουχία:** Δεν είναι διαθέσιμα κλινικά δεδομένα σχετικά με την έκθεση κατά την εγκυμοσύνη στην ινσουλίνη glargine. Το δεδομένο από μεγάλο αριθμό εγκύων γυναικών (περισσότερες από 1000 περιπτώσεις έκδοσης κύησης) τεκμηριώνουν απουσία συγκεκριμένων ανεπιθύμητων ενεργειών και δεν υπάρχει συγκεκριμένη διακοπή ή έμβρυο-τοξική από την χρήση της ινσουλίνης glargine. Μελέτες σε ζώα δεν έδειξαν αναπαραγωγική τοξικότητα. Η χρήση της ABASAGLAR μπορεί να αποτελεί εναλλακτική επιλογή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης εάν είναι αναγκαίο. Δεν είναι γνωστό εάν η ινσουλίνη glargine απεκκρίνεται στο μητρικό γάλα. Δεν αναμένεται μεταβολική επίδραση στα θηλάζοντα νεογνώντα/θηρτό από τη λήψη της ινσουλίνης glargine, επειδή η ινσουλίνη glargine είναι ένα πεπτιδικό που διασπάται σε αμινοξέα στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα. Σε γυναικές που θηλάζουν μπορεί να απαιτηθεί ρύθμιση της δόσης ινσουλίνης και της διαίτας. Μελέτες σε ζώα δεν έδειξαν όμοια τοξικότητα στα γονιμότητα. **Επιδράσεις στην ικανότητα οδήγησης και χειρισμού μηχανών:** η ικανότητα του ασθενούς να συγκεντρωθεί και να ανταποκριθεί μπορεί να επηρεαστεί από αποτέλεσμα της υπογλυκαιμίας ή της υπεργλυκαιμίας. **Ανεπιθύμητες ενέργειες:** η υπογλυκαιμία, γενικά η πιο συχνή ανεπιθύμητη αντίδραση κατά την ινσουλινθεραπεία, μπορεί να εμφανιστεί αν η δόση της ινσουλίνης είναι πολύ υψηλή σε σχέση με τις απαιτήσεις για ινσουλίνη. Οι ακόλουθες σχετιζόμενες ανεπιθύμητες αντιδράσεις από κλινικές δοκιμές παρατηρήθηκαν παρόμοια σύμφωνα με τον προτεινόμενο ορό MedDRA κατάταξη ανά οργανικό σύστημα. Υπογλυκαιμία, πολύ συχνή $\geq 1/10$. Αλλεργικές αντιδράσεις, σπάνια διαταραχή και αμφιβληννοειδής: σπάνια $\geq 1/10.000$ έως $<1/10.000$. Λοιμοποίηση: όχι συχνή $\geq 1/10.000$ έως $<1/10.000$. Δυσγευσία και μυαλγία: πολύ σπάνια $<1/10.000$. Παθολογικός πλινθισμός γενικά, το προφίλ ασφαλείας σε παιδιά και εφήβους (ηλικίας ≤ 18 ετών) είναι παρόμοιο με το προφίλ ασφαλείας των ενηλίκων. Οι αναφορές ανεπιθύμητων αντιδράσεων που ελήφθησαν από την παρακολούθηση μετά την κυκλοφορία της ABASAGLAR, περιλαμβάνουν σχετικά πιο συχνές αντιδράσεις στη θέση της ένεσης (αίμας στη θέση της ένεσης, αντίδραση στη θέση της ένεσης) και δερματικές αντιδράσεις (εξάνθημα, κνίδωση) σε παιδιά και εφήβους (ηλικίας ≤ 18 ετών) έναντι των ενηλίκων. Δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία από κλινικές μελέτες ως προς την ασφάλεια σε παιδιά ηλικίας μικρότερης των 2 ετών. **Ελλάδα:** Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων, Μεσογείων 284 GR-15562 Χαλκίδα, Αθήνα, Τηλ: +30 21 3204380/337, Φαξ: +30 21 06549585, ιστοσελίδα: <http://www.efpi.gr>. **Φαρμακοδυναμικές ιδιότητες:** Φαρμακοδυναμική κατηγορία: Φάρμακα που χρησιμοποιούνται στο διαβήτη, ινσουλίνες και ενέσιμα ανάλογα, μακράς δράσης. Κωδικός ATC: A10AEB, Η ABASAGLAR είναι δια-αμενέος φαρμακευτικό προϊόν. Λαμβάνοντας υπόψη τη φαρμακοδυναμική του είναι διαθέσιμο στο δικαστικό τόπο του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Φαρμάκων: <http://www.ema.europa.eu>. **Κατάλογος εκδόχων:** οξείδιο του ψευδαργύρου, μετακροτάλη, γλυκερόλη, υδροκλωρικό οξύ (για τη ρύθμιση του pH), υδροχλωρικό νατρίου (για τη ρύθμιση του pH), υδροχλωρικό νατρίου (για να ανιχνεύεται με άλλα φαρμακευτικά προϊόντα). Διάρκεια ζωής 2 χρόνια. Διάρκεια ζωής μετά την πρώτη χρήση: το φαρμακευτικό προϊόν μπορεί να φυλάσσεται το μέγιστο 28 ημέρες σε θερμοκρασία έως και 30 °C και μακριά από την απευθείας έκθεση στο φως ή την απευθείας έκθεση στο φως. Η πένα που χρησιμοποιείται δεν πρέπει να φυλάσσεται σε ψυγείο. Το προστατευτικό καπάκι της πέννας πρέπει να τοποθετείται στην πένα μετά από κάθε ένεση για να προστατευτεί από το φως. **Πιοτεχνικές πληροφορίες κατά τη φύλαξη του προϊόντος πριν από τη χρήση:** φυλάσσεται σε ψυγείο (2 °C – 8 °C), Μην καταψύξετε. Φυλάσσεται στην προγεμισμένη πένα στο εξωτερικό κομμάτι για να προστατευτεί από το φως. **ΜΟΡΦΕΣ/ΤΙΜΕΣ:** ABASAGLAR INJ SOL 100U/mL 2 Bx5x5 PF-PEN KWIKPEN x 3ML, ΧΤ: 66.87€, ΝΤ: 58.18€, ΑΤ: 85.09€. ABASAGLAR INJ SOL 100 μονάδες/ML 2 Bx10x10 CARTRIDGES x 3ML, ΧΤ: 72.44€, ΝΤ: 63.02€, ΑΤ: 92.15€. **ΚΑΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΑΔΕΙΑΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΣ:** Eli Lilly Regional Operations GmbH, Kolbengasse 9-10, 1030, Vienna, Αυστρία. **ΑΡΙΘΜΟΙ ΑΔΕΙΑΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΣ:** EU/114/944/008 και EU/114/944/009. **ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΠΡΩΤΗΣ ΕΓΚΡΙΣΗΣ / ΑΝΑΝΕΩΣΗΣ ΤΗΣ ΑΔΕΙΑΣ:** 09 Σεπτεμβρίου 2014. **ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΝΑΝΕΩΡΣΗΣ ΤΟΥ ΚΕΙΜΕΝΟΥ:** Ιανουάριος 2017. **ΤΡΟΠΟΣ ΔΙΑΘΕΣΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ:** φαρμακευτικό προϊόν για το οποίο απαιτείται ιατρική συνταγή. ΕΠΙΧΟΡΗΓΗΣΗ ΑΠΟ ΤΑ ΤΑΜΕΙΑ: 100% για ασθενείς με ΣΔ1 και 90% για ασθενείς με ΣΔ2.

ΜΕ ΕΝΔΕΙΞΗ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΟΔΟΝΤΙΚΟ ΠΟΝΟ¹

Το ARCOXIA[®] τώρα ενδείκνυται και για τη μικρής διάρκειας θεραπεία του μετεγχειρητικού μέτριου οδοντικού πόνου¹



**Για τη μικρής διάρκειας
θεραπεία του¹**

**Μετεγχειρητικού
Μέτριου Οδοντικού Πόνου**

**90mg μια φορά την ημέρα
μέγιστη διάρκεια 3 ημέρες.**

Η απόφαση για να συνταγογραφηθεί ένας εκλεκτικός COX-2 αναστολέας θα πρέπει να βασίζεται στην εκτίμηση των συνολικών ατομικών κινδύνων του ασθενούς.¹
Δόσεις υψηλότερες από αυτές που συνιστώνται για κάθε ένδειξη είτε δεν έχουν εμφανίσει επιπρόσθετη αποτελεσματικότητα ή δεν έχουν ακόμα μελετηθεί. Λόγω των καρδιαγγειακών κινδύνων, πρέπει να χορηγείται η χαμηλότερη αποτελεσματική ημερήσια δόση του ARCOXIA για τη μικρότερη δυνατή διάρκεια θεραπείας.¹

Πριν τη συνταγογράφηση του ARCOXIA[®], συμβουλευθείτε την περίληψη χαρακτηριστικών του προϊόντος για αντενδείξεις, προειδοποιήσεις, προφυλάξεις και ανεπιθύμητες ενέργειες.

Βιβλιογραφία: 1. Arcoxia GRSPC



BIANEX A.E. ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΦΑΡΜΑΚΩΝ
ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΤΟΥ ΟΜΙΛΟΥ ΓΙΑΝΝΑΚΟΠΟΥΛΟΥ

LICENSEE/DISTRIBUTOR OF **MERCK SHARP & DOHME**, Division of MERCK & Co., Inc., Whitehouse Station, N.J., USA.

Γραφεία Επιστημονικής Ενημέρωσης

ΑΘΗΝΑ: Οδός Τατοίου 146 71 Ν. Ερυθραία, Τηλ.: 210 8009111 • **E-Mail:** mailbox@vianex.gr • **INTERNET:** <http://www.vianex.gr> • **ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ:** Ακαδημίου 113, Κόμβος Μακρυγιάννη, Εύσμιος Θεσσαλονίκης, ΤΚ 56224, Τηλ: 2310 861683 • **ΠΑΤΡΑ:** Μαιζώνος 131, Τηλ: 2610 221397

† Registered Trademark of Merck & Co., Inc., of Whitehouse Station New Jersey, U.S.A. & used under licence from MERCK & Co., INC.