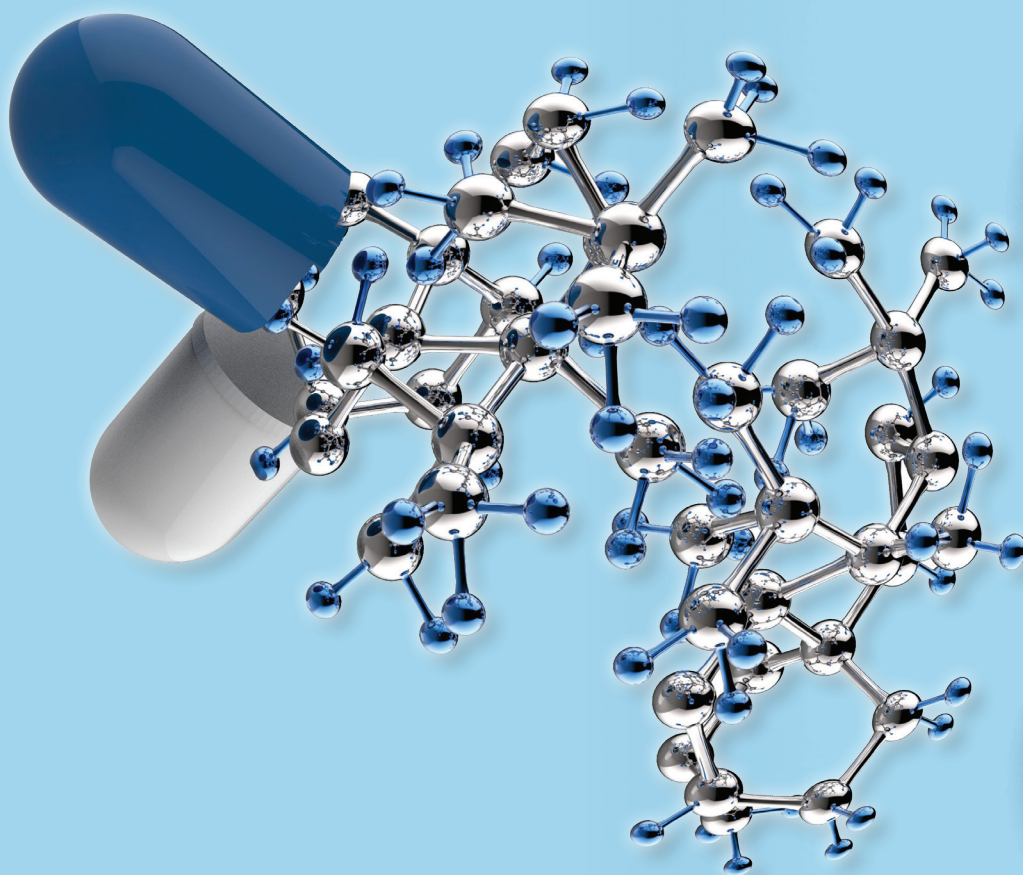


ISSN 1105-4999



ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ PHARMAKEFTIKI

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



ΤΟΜΟΣ 34 • ΤΕΥΧΟΣ II
VOLUME ISSUE

ΙΟΥΛΙΟΣ - ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2022
JULY - SEPTEMBER

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

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

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΣΥΝΤΑΞΗΣ

A. Τσαντίλη

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

ΑΡΧΙΣΥΝΤΑΚΤΗΣ

Γ.Α. Καρίκας

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

ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κ. Δεμέτζος

Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Β. Δημόπουλος

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, ΑΠΘ

Ν. Κόλμαν

Galenica SA

Χ. Κοντογιώργης,

Επ. Καθηγητής, Δ.Π.Θ.

Π. Κουρουνάκης

Ομοτ. Καθηγητής,

Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, ΑΠΘ

Π. Μαχαίρας

Ομοτ. Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Σ. Νικολαρόπουλος

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Γ. Πάιρας

Αναπλ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Ε. Παντερή

Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ

Δ. Ρέκκας

Αναπλ. Καθηγητής, ΕΚΠΑ

PHARMAKEFTIKI

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

EDITOR

A. Tsantili

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

CO EDITOR

G.A. Karikas

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

EDITORIAL BOARD

C. Demetzos

Professor, NKUA

V.J. Demopoulos

Professor, University of Thessaloniki, AUTH

N. Kolman

Galenica SA

Ch. Kontogiorgis

Assistant Professor, D.U.Th.

P. Kourounakis

Emeritus Professor,

University of Thessaloniki, AUTH

P. Macheras

Emeritus Professor, NKUA

S. Nikolaropoulos

Professor, University of Patras

G. Pairas

Associate Professor, University of Patras

I. Panderi

Professor, NKUA

D. Rekkas

Associate Professor, NKUA

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

E-mail για υποβολή εργασιών:

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

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

E-mail for manuscript submission:

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

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

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

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



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

εμείς τον ενθουσιασμό και την εμπειρία . . .

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



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

www.zita-group.com

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ / CONTENTS

Κορωνοϊός SARS-CoV-2: Παθογένεια, Φαρμακοθεραπεία και Αντιμετώπιση με Μονοκλωνικά Αντισώματα

Σοφία Άννα Ντούσι, Ευάγγελος Δ. Καραλής 39-67

In silico Προγνωστικές Μέθοδοι Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων και Τοξικότητας Παραγώγων Προπαργυλαμίνης, Αναστολέων της Μονοαμινοοξειδάσης

Παναγιού Μαυροειδή, Νικήτας Γεωργίου, Αφροδίτη
Βογιατζάκη, Αναστασία Μαρία Κούβαρη, Ελένη Σίσκου,
Γιώργος Αποστολόπουλος, Νικόλαος Τζούρας, Σταύρος Π.
Νεοφώτιστος, Γιώργος Χ. Βουγιουκαλάκης, Άννα Τσαντίλη-
Κακουλίδου, Θωμάς Μαυρομούστακος 68-83

Formulation and In-vitro Evaluation of the Ophthalmic Hydrogel Containing Cromolyn Sodium

Fahimeh Sakhaie, Seyed Alireza Mortazavi, Fatemeh
Ghorbani-Bidkorbeh, Zahra Hashemi 84-95

Εκδηλώσεις 96

SARS-CoV-2 coronavirus: pathogenesis, pharmacotherapy and treatment with monoclonal antibodies

Sofia Ntousi, Vangelis Karalis 39-67

In silico Prognostic Methods for Physicochemical Properties and Toxicity of Propargylamine Derivatives, Inhibitors of Monoaminoxidase

Panagiou Mavroei, Nikitas Georgiou, Afroditi Vogiatzaki,
Anastasia Maria Kouvari, Eleni Siskou,
George Apostolopoulos, Nikolaos V. Tzouras,
Stavros P. Neofotistos, George Vougioukalakis,
A. Tsantili-Kakoulidou,
Thomas Mavromoustakos 68-83

Formulation and In-vitro Evaluation of the Ophthalmic Hydrogel Containing Cromolyn Sodium

Fahimeh Sakhaie, Seyed Alireza Mortazavi, Fatemeh
Ghorbani-Bidkorbeh, Zahra Hashemi 84-95

Εκδηλώσεις 96

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ
ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΧΗΜΕΙΑΣ
& ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

PHARMAKEFTIKI

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



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

Κορωνοϊός SARS-CoV-2: Παθογένεια, Φαρμακοθεραπεία και Αντιμετώπιση με Μονοκλωνικά Αντισώματα

Σοφία Άννα Ντούσι, Ευάγγελος Δ. Καραλής

Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

KEYWORDS:

Κοροναϊός; Φάρμακα;
Μονοκλωνικά
αντισώματα;
Φαρμακοκινητική

ARTICLE INFO:

Received: March: 29, 2022

Revised: April 18, 2022

Accepted: April, 22, 2022

published on line: July, 19, 2022

* CORRESPONDING AUTHOR:

Ευάγγελος Δ. Καραλής
Τμήμα Φαρμακευτικής,
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών, 15784,
Αθήνα, Ελλάδα
Email: vkaralis@pharm.uoa.gr

ABSTRACT

Η νόσος COVID-19 πρωτοεμφανίστηκε το 2019 και εξαπλώθηκε ευρέως. Ο ιός SARS-CoV-2 που την προκαλεί ανήκει στους κοροναϊούς και μεταδίδεται ραγδαίως κυρίως μέσω των σταγονιδίων. Με την νόσηση, παρατηρείται αυξημένη έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Οι μέθοδοι διάγνωσης είναι ποικίλοι με κύρια και πιο έμπιστη την RT-qPCR που βασίζεται στην ανίχνευση RNA. Για την πρόληψη της νόσου είναι απαραίτητος ο εμβολιασμός των ανθρώπων. Τα εμβόλια κατά του COVID-19 χρησιμοποιούν ιικούς φορείς, το mRNA του ιού, ορισμένες υπομονάδες του ιού όπως η πρωτεΐνη ακίδας (S) αλλά και ο ίδιος ο ιός αδρανοποιημένος. Για την θεραπεία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ορισμένα φάρμακα που παλιότερα χρησιμοποιούνταν για άλλες παθήσεις αλλά ένας πολλά υποσχόμενος δρόμος είναι η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων. Τα εξουδετερωτικά μονοκλωνικά αντισώματα έχουν ως πρωταρχικό στόχο την πρωτεΐνη ακίδας (S) του SARS-CoV-2.

Τα περισσότερα μονοκλωνικά αντισώματα έχουν εντοπιστεί για την αναγνώριση του θραύσματος S1 του SARS-CoV2 και ο τομέας σύνδεσης υποδοχέα (RBD) στην υπομονάδα S1 είναι ο πιο σημαντικός στόχος για τον SARS-CoV-2, καθώς τα μονοκλωνικά αντισώματα μπορούν να εμποδίσουν την αλληλεπίδραση του RBD και του ACE2 του υποδοχέα. Όταν χρησιμοποιούνται mAbs anti-SARS-CoV-2, η θεραπεία θα πρέπει να ξεκινά το συντομότερο δυνατό αφού ο ασθενής λάβει θετικό διαγνωστικό αποτέλεσμα και εντός 10 ημερών από την έναρξη των συμπτωμάτων. Επί του παρόντος, τρία προϊόντα μονοκλωνικών αντισωμάτων έχουν εγκρίνει τη χρήση για τον COVID-19 και πιο συγκεκριμένα bamlanivimab/etesevimab, casirivimab/imdevimab και sotrovimab. Η κατανόηση της φαρμακοκινητικής και της φαρμακοδυναμικής τους είναι απαραίτητη για επιλογή του σωστού αντισώματος, της σωστής δόσης και του σχήματος για ένδειξη στόχου. Στα πλαίσια αυτά, στην παρούσα μελέτη γίνεται μία συνολική θεώρηση της φαρμακολογίας, φαρμακοκινητικής και δοσολογικών σχημάτων των μονοκλωνικών αντισωμάτων για τον ιό SARS-CoV-2.

1. Εισαγωγή

Οι άνθρωποι έχουν γίνει μάρτυρες τριών θανατηφόρων πανδημιών μέχρι στιγμής στον εικοστό πρώτο αιώνα που σχετίζονται με νέους κοροναϊούς: SARS, αναπνευστικό σύνδρομο Μέσης Ανατολής (MERS) και COVID-19¹. Η λέξη «Πανδημία» έχει ληφθεί από την ελληνική γλώσσα και σημαίνει «όλου του λαού». Τυπικά αναφέρεται στην εκτεταμένη εμφάνιση μιας ασθένειας σε μία ή περισσότερες περιοχές του κόσμου. Αντιθέτως, η τοπική εμφάνιση λοιμώξεων η οποία συνήθως οφείλεται σε εποχικά στελέχη ιών ονομάζεται επιδημία. Οι πανδημίες προκύπτουν όταν νέα στελέχη ιών μολύνουν τον άνθρωπο και προωθούν τη μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο προτού αναπτυχθεί αξιόλογη ανοσία για την καταπολέμηση αυτών των στελεχών. Οι πανδημίες εμφανίζονται λόγω διαφόρων γενετικών μηχανισμών, έχουν απρόβλεπτα πρότυπα θνησιμότητας μεταξύ ατόμων όλων των ηλικιακών ομάδων και διαφέρουν πολύ ως προς το πώς και πότε εμφανίζονται και επανεμφανίζονται².

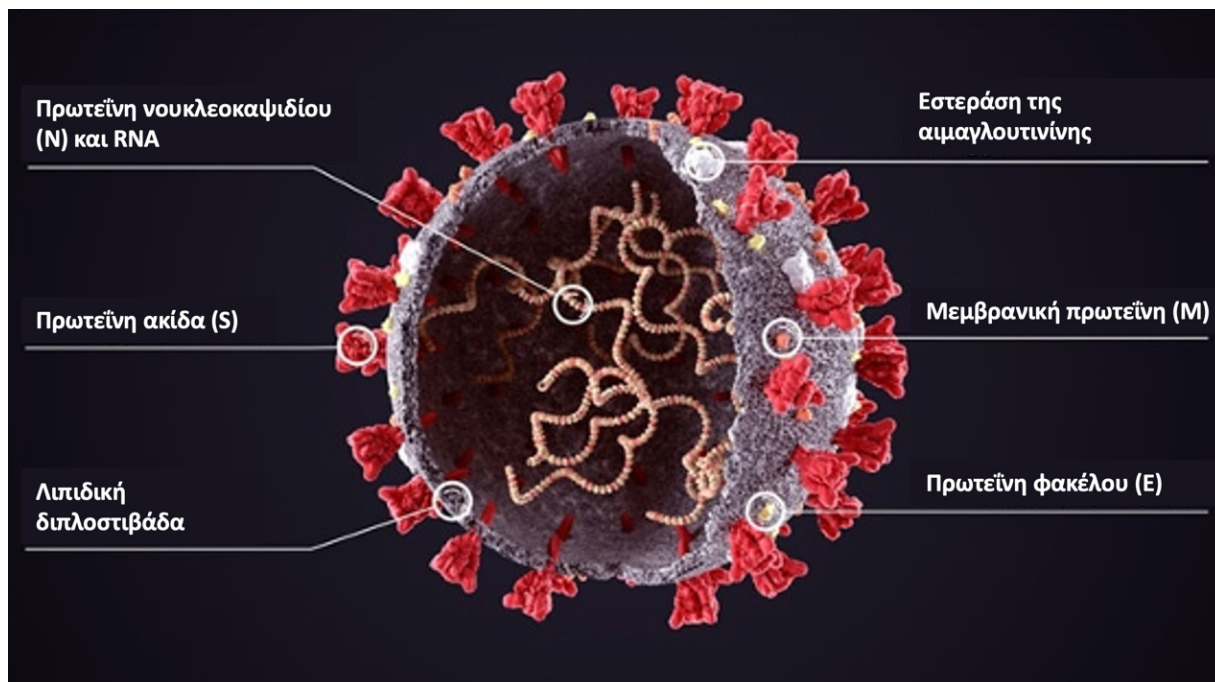
Η νόσος COVID-19 είναι μια εξαιρετικά μεταδοτι-

κή ιογενής λοίμωξη που προκαλείται από έναν άλλο ζωονοσογόνο νέο κορωνοϊό που ονομάζεται SARS-CoV-2 και είναι μιας κλίμακας που δεν έχει παρατηρηθεί από την πανδημία γρίπης το 1918. Η ασθένεια εμφανίστηκε για πρώτη φορά στη Γουχάν της Κίνας, τον Δεκέμβριο του 2019 και εξαπλώθηκε γρήγορα σε όλο τον κόσμο, μόλυνε 48.539.872 ανθρώπους και προκάλεσε 1.232.791 θανάτους σε 215 χώρες και η μόλυνση εξαπλώνεται ακόμα³.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας κήρυξε το ξέσπασμα έκτακτης ανάγκης για τη δημόσια υγεία διεθνούς ανησυχίας στις 30 Ιανουαρίου 2020 και στις 11 Μαρτίου 2020, το ξέσπασμα κηρύχθηκε παγκόσμια πανδημία⁴.

1.1 Δομή ιού

Οι κοροναϊοί (CoV) αναγνωρίστηκαν ως ανθρώπινα παθογόνα τη δεκαετία του 1960. Είναι ιοί θετικού κλώνου RNA με περίβλημα της τάξης των Nidovirales. Με τη χαρακτηριστική τους επιφάνεια, τα ισωμάτια έχουν εμφάνιση σαν κορώνες κάτω από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, γι' αυτό και οι ιοί ονομάζονται από



Σχήμα 1: Δομή κοροναϊού προσαρμοσμένο από την παραπομπή¹⁰.

τη λατινική λέξη «corona», που σημαίνει στέμμα ή φωτοστέφανο. Υπάρχουν επί του παρόντος επτά κοροναϊοί που είναι γνωστό ότι μολύνουν ανθρώπους⁵. Τέσσερα από αυτά προκαλούν ήπια έως μέτρια νόσο. Πιο συγκεκριμένα, τα HCoV-OC43, HCoV-HKU1 και HCoV-229E προκαλούν κοινά κρυολογήματα και σοβαρές λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος σε άτομα της νεότερης και μεγαλύτερης ηλικίας, ενώ ο HCoV-NL63 είναι σημαντική αιτία βρογχολίτιδας σε παιδιά. Τα άλλα τρία προκαλούν πιο σοβαρή, ακόμη και θανατηφόρα ασθένεια και έχουν εμφανιστεί πιο πρόσφατα, τα τελευταία 20 χρόνια. Πρόκειται για τον SARS-CoV υπεύθυνος για το Σοβαρό Οξύ Αναπνευστικό Σύνδρομο (SARS) που εμφανίστηκε το 2002, MERS-CoV το αναπνευστικό σύνδρομο της Μέσης Ανατολής (MERS) που εμφανίστηκε το 2012 και ο SARS-CoV-2, που εντοπίστηκε μέσω μιας ομάδας περιπτώσεων πνευμονίας στα τέλη του 2019⁵.

Κάθε ιός SARS-CoV-2 έχει διάμετρο 50–200 νανόμετρα⁶. Όπως και άλλοι κοροναϊοί, ο SARS-CoV-2 έχει τέσσερις δομικές πρωτεΐνες, γνωστές ως πρωτεΐνες S (φλέβα ή ακίδα), E (κέλυφος), M (μεμβράνη) και N (νουκλεοκαψίδιο)⁷. Οι πρωτεΐνες S, E και M μαζί σχηματίζουν τον ιικό φάκελο, ενώ η πρωτεΐνη N διατηρεί το γονιδίωμα του RNA. Η πρωτεΐνη S περιλαμβάνει μια N-τερματική S1 υπομονάδα η οποία είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση ιού-υποδοχέα και μια C-τερματική υπομονάδα S2 που είναι υπεύθυνη για τη σύντηξη της μεμβράνης ιού-κυττάρου. Η S1 υπομονάδα διαιρείται περαιτέρω σε μια N-τερματική περιοχή (NTD) και μια περιοχή δέσμησης υποδοχέα (RBD)^{8,9}.

Ο SARS-CoV-2 στοχεύει τα κύτταρα μέσω της πρωτεΐνης S, η οποία συνδέεται με τον ανθρώπινο υποδοχέα του ενζύμου μετατροπής της αγγειοτενσίνης 2 (ACE2) και χρησιμοποιεί την κυτταρική πρωτεάση σερίνης TMPRSS2 για την εκκίνηση της πρωτεΐνης S³. Με αυτή τη δέσμευση πυροδοτείται μία σειρά γεγονότων που οδηγούν σε σύντηξη μεταξύ των κυτταρικών και ιικών μεμβρανών για είσοδο του ιού στα κύτταρα. Το ιικό RNA συντίθεται από RNA-εξαρτώμενη πολυμεράση. Η σύνθεση δομικών πρωτεϊνών ακολουθείται από συναρμολόγηση ιικών σωματιδίων και απελευθέρωση. Το γονιδίωμα του ιικού RNA απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα μετά τη

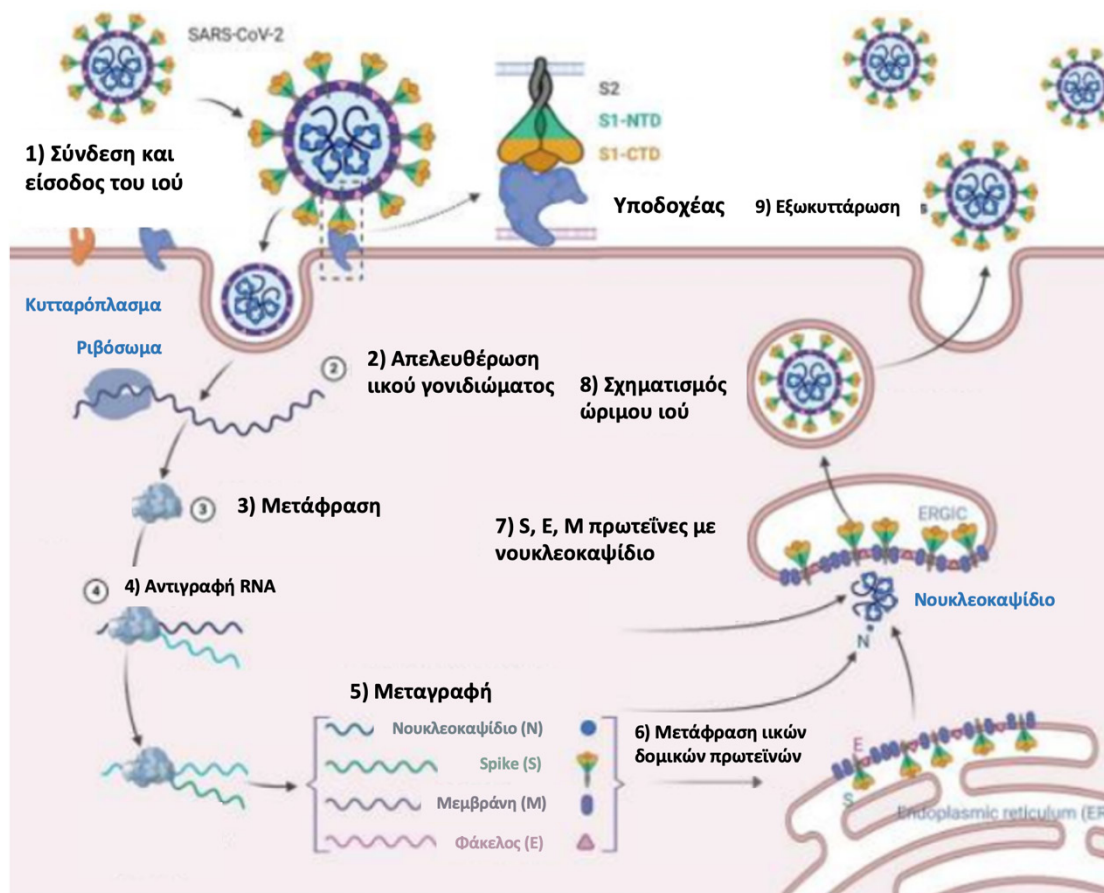
σύντηξη της μεμβράνης. Έπειτα, οι πολυπρωτεΐνες συντίθενται για να κωδικοποιήσουν το σύμπλεγμα ιικής ρεπλικάσης-μεταγραφάσης^{11,12}.

1.2 Μετάδοση

Οι περισσότεροι κοροναϊοί μολύνουν ζώα (δηλαδή νυχτερίδες, πτηνά και θηλαστικά) τα οποία λειτουργούν ως ενδιάμεσος ξενιστής. Μερικές φορές όμως αλλάζουν ξενιστή και μολύνουν τον άνθρωπο⁵. Αν και είναι ακόμα άγνωστο πώς ο SARS-CoV-2 μεταδίδεται από τις νυχτερίδες στον άνθρωπο, η ταχεία μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο έχει επιβεβαιωθεί ευρέως³. Ο κύριος τρόπος με τον οποίο οι άνθρωποι μολύνονται με τον SARS-CoV-2 είναι μέσω της έκθεσης σε αναπνευστικά υγρά που μεταφέρουν τον μολυσματικό ιό. Η έκθεση συμβαίνει με διάφορους τρόπους όπως είναι η εισπνοή πολύ λεπτών αναπνευστικών σταγονιδίων και σωματιδίων αερολύματος, η εναπόθεση αναπνευστικών σταγονιδίων και σωματιδίων σε εκτεθειμένους βλεννογόνους στο στόμα, τη μύτη ή τα μάτια με άμεσες πιτσιλιές και ψεκασμούς και το άγγιγμα των βλεννογόνων με χέρια που έχουν λερωθεί είτε απευθείας με αναπνευστικά υγρά που περιέχουν ιούς είτε έμμεσα αγγίζοντας επιφάνειες με ιό.

Οι άνθρωποι απελευθερώνουν αναπνευστικά υγρά κατά την εκπνοή (π.χ. ήσυχη αναπνοή, ομιλία, τραγούδι, άσκηση, βήχας, φτέρνισμα) με τη μορφή σταγονιδίων σε ένα φάσμα μεγεθών. Αυτά τα σταγονίδια μεταφέρουν ιούς και μεταδίδουν την μόλυνση¹³. Το φτάρνισμα και ο ξηρός βήχας από ασθενείς με COVID-19 δημιουργούν μεγέθη σταγονιδίων που κυμαίνονται μεταξύ 0,6–100 μm και ο αριθμός των σταγονιδίων αυξάνεται αναλογικά με το ρυθμό βήχα¹⁴. Περισσότερο από το 97% αυτών των σταγονιδίων τείνουν να είναι μικρότερα από 50 μm και η πλειοψηφία τους είναι μικρότερα από 10 μm¹⁵. Οι προ- ή ασυμπτωματικοί ασθενείς μπορούν επίσης να δημιουργήσουν και να εκπέμπουν μεγάλες ποσότητες σταγονιδίων, μικρότερες από 1 μm, μέσω της φυσιολογικής αναπνοής και ομιλίας¹⁶.

Η περίοδος επώασης είναι ο κατά προσέγγιση χρόνος από την πρώτη έκθεση στον ιό μέχρι την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων ή σημείων. Σε αυτήν την περίοδο οι ασθενείς μπορούν επίσης



Σχήμα 2: Κύκλος ζωής του ιού προσαρμοσμένο από την παραπομπή³.

να μεταδώσουν τον ιό¹⁷. Αντιθέτως, οι ασυμπτωματικές λοιμώξεις δεν έχουν ειδική επώαση λόγω έλλειψης κλινικών σημείων. Ωστόσο έχει διαπιστωθεί ότι το ιικό φορτίο που ανιχνεύθηκε σε ασυμπτωματικούς πληθυσμούς ήταν παρόμοιο με αυτό σε συμπτωματικούς ασθενείς. Έτσι αποδεικνύεται ότι οι ασυμπτωματικές λοιμώξεις έχουν τη δυνατότητα μετάδοσης, η οποία μπορεί να συμβεί νωρίς στην πορεία της λοίμωξης¹⁸. Γενικά, η μολυσματικότητα εξαρτάται κυρίως από το εάν ο ιός βρίσκεται σε αναπαραγωγική κατάσταση. Για παράδειγμα, σε ορισμένες περιπτώσεις παρά τα συνεχιζόμενα υψηλά ιικά φορτία, δεν μπορεί να απομονωθεί ζωντανός ιός. Αυτό σημαίνει ότι η θετικότητα του ιικού νουκλεϊκού οξέος δεν υποδηλώνει μολυσματικότητα¹⁹.

1.3 Παθοφυσιολογία

Διάφοροι δυνητικοί παθογόνοι μηχανισμοί μπορεί να εμπλέκονται στον COVID-19, συμπεριλαμβανομένης της πήξης, της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και της υπερβολικής απελευθέρωσης προφλεγμονωδών κυτοκινών. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που προκαλείται από λοίμωξη ενεργοποιεί την υπερβολική παραγωγή θρομβίνης και αναστέλλει την ινωδόλυση, οδηγώντας σε υπερπηκτικότητα²⁰.

Το σύνδρομο απελευθέρωσης κυτοκίνης μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο σε ασθενείς με σοβαρή COVID-19 όπως και σε σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS). Το ARDS είναι ένα σύνθετο κλινικό σύνδρομο οξείας αναπνευστικής ανεπάρκειας που αναπτύσσεται από μη καρδιογε-

νές πνευμονικό οίδημα. Η βακτηριακή και η ιογενής πνευμονία είναι οι πιο συχνές κλινικές διαταραχές που σχετίζονται με την ανάπτυξη του ARDS^{21, 22}. Τα παθολογικά χαρακτηριστικά του ARDS που σχετίζεται με τον COVID-19 είναι η διάχυτη φατνιακή βλάβη με σχηματισμό υαλώδους μεμβράνης και εναπόθεση ινών, καθώς μπορεί να παρατηρηθούν και μερικά πολυπύρρηνα διευρυμένα κύτταρα²⁰.

Όσο αφορά την διαδικασία της μόλυνσης, κατά την πρώιμη φάση, ο SARS-CoV-2 διεισδύει στο πνευμονικό παρέγχυμα και αρχίζει να πολλαπλασιάζεται. Το ACE2 και το TMPRSS2 (διαμεμβρανική πρωτεάση σερίνης 2) παίζουν κρίσιμους ρόλους στην κυτταρική είσοδο του SARS-CoV-2. Η υπομονάδα S1 της πρωτεΐνης ακίδας προσκολλάται στον κυτταρικό συνδέτη ACE2 στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή. Η εκκίνηση της κυτταρικής πρωτεάσης με το TMPRSS2 διευκολύνει τη διάσπαση της υπομονάδας S1/S2 της πρωτεΐνης ακίδας και η υπομονάδα S2 επιτρέπει τη σύντηξη του ιού μέσω των κυτταρικών μεμβρανών του ξενιστή²³.

Η παρατεταμένη περίοδος επώασης της ιογενούς λοίμωξης βοηθά αποτελεσματικά τον ιό να ξεφύγει από την έμφυτη ανοσολογική απόκριση στο πρώιμο στάδιο της μόλυνσης. Έχει παρατηρηθεί πως η μη ρυθμισμένη έμφυτη ανοσοαπόκριση προκαλεί θανατηφόρα πνευμονία σε νέους ασθενείς με μόλυνση από SARS-CoV-2. Για αυτόν τον λόγο οι έμφυτες ανοσολογικές αποκρίσεις της IFN τύπου I και των μονοκυττάρων-μακροφάγων πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω σε ασθενείς με COVID-19²⁴. Τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα ενεργοποιούν τα T-εξαρτώμενα B-κύτταρα για την προώθηση ειδικών για τον ιό αντισωμάτων. Τα κυτταροτοξικά T κύτταρα σκοτώνουν απευθείας τα μολυσμένα από τον ιό κύτταρα. Ιδιαίτερα, τα βοηθητικά T κύτταρα προάγουν το μονοπάτι σηματοδότησης NF-kB για την εισαγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών²⁵.

Η δεύτερη φάση ονομάζεται πνευμονική φάση και χαρακτηρίζεται από την παρουσία φλεγμονώδους απόκρισης, ιστικής βλάβης και αναπνευστικής ανεπάρκειας. Η είσοδος του ιού στους ανθρώπινους πνευμονικούς ιστούς προκάλεσε στις περισσότερες περιπτώσεις ήπια δυσλειτουργία της ανώτερης αναπνευστικής οδού²⁴. Πιστευόταν ότι η αντιγραφή του

ιού και η εκβλάστηση πυροδοτούν τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου 2 να υποστούν απόπτωση και επιθηλιακή αναγέννηση κυττάρων, παρόμοια με αυτή του SARS-CoV. Ωστόσο, η αναπνευστική ανεπάρκεια που προκαλείται από τον COVID-19 εμφάνισε διαφορετικά χαρακτηριστικά από αυτά του τυπικού ARDS. Πιο απλά οι φλεγμονώδεις οδοί ενεργοποιούνται όταν ο πνεύμονας τραυματίζεται από μόλυνση ή φλεγμονώδεις καταστάσεις. Τα επίπεδα κυτοκινών είναι υπερβολικά. Με την ανάπτυξη οξειδωτικού στρες καθώς και με την παρουσία απορρυθμισμένης και υπερβολικής φλεγμονής προκαλείται η βλάβη και η νέκρωση των κυψελιδικών κυττάρων²⁶. Η αυξημένη ενδοθηλιακή και επιθηλιακή διαπερατότητα οδηγεί στη συσσώρευση υγρού κυψελιδικού οιδήματος πλούσιου σε πρωτεΐνες. Έτσι η λειτουργία του κυψελιδικού φραγμού και η ωσμωτική κλίση που οδηγεί την κάθαρση του κυψελιδικού υγρού διαταράσσονται. Η κυτταρική νέκρωση και η συσσώρευση υγρού οιδήματος πυροδοτούν πιο έντονη φλεγμονώδη και ανοσολογική απόκριση. Η συσσώρευση υγρού πνευμονικού οιδήματος στο διάμεσο και στον αέρα του πνεύμονα προκαλεί διαταραχή της ανταλλαγής αερίων, που οδηγεί σε υποξαιμία, σε μειωμένη έκκριση διοξειδίου του άνθρακα και σε οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια. Περίπου το 20% των μολυσμένων ασθενών ανέπτυξε υποξία, διήθηση από εσφυρισμένο γυαλί και ARDS, με αποτέλεσμα την πολλαπλή ανεπάρκεια οργάνων. Επιπλέον, παρατηρούνται σοβαρές ουλές και ίνωση των πνευμονικών κυττάρων²⁵.

Τέλος, η φάση της υπερφλεγμονής χαρακτηρίζεται από την παρουσία συστηματικής φλεγμονής και βλάβης απομακρυσμένων οργάνων ως αποτέλεσμα της αυξημένης φλεγμονώδους απόκρισης του ξενιστή και της υπερπηκτικότητας. Στην κατάσταση αυτή οφείλεται η πολυοργανική ανεπάρκεια. Επιπλέον, παρατηρήθηκε υψηλός αριθμός λευκοκυττάρων με λεμφοπενία και αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτοκινών στο πλάσμα, με ιδιαίτερα υψηλότερα επίπεδα των IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), του παράγοντα διέγερσης αποϊκίας κοκκιοκυττάρων (G-CSF), της επαγωγίσιμης από ιντερφερόνη γάμμα πρωτεΐνης (IP) 10, της μονοκυτταρικής χημειοελκυστικής πρωτεΐνης (MCP) 1, της φλεγμονώδους πρωτεΐνης μακροφάγου (MIP) 1α και

του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF) α σε ασθενείς με σοβαρή COVID-19^{25, 27}. Αυτή η «καταιγίδα κυτοκινών» προκαλεί φλεγμονώδη βλάβη στους πνεύμονες με απειλητικές για τη ζωή επιπλοκές όπως πολυοργανική ανεπάρκεια, ARDS, σηπτικό σοκ, αιμορραγία/πηκτικότητα, οξεία καρδιακή/ηπατική βλάβη/νεφρική βλάβη και δευτερογενείς βακτηριακές λοιμώξεις²⁴.

1.4 Συμπτώματα Ασθένειας

Η νόσος COVID-19 περιλαμβάνει κλινικά χαρακτηριστικά που εμφανίζονται σε ποικίλο τύπο, συχνότητα, σοβαρότητα και σε διαφορετικές ηλικιακές ομάδες. Τα συμπτώματα που απουσιάζουν κατά την έναρξη της νόσου μπορεί να αναπτυχθούν με την πάροδο του χρόνου με την εξέλιξη της νόσου. Δεν υπάρχει πλήρης λίστα συμπτωμάτων που να έχει επικυρωθεί ότι έχουν υψηλή ειδικότητα ή ευαισθησία για τον COVID-19. Είναι πιθανό, καθώς εμφανίζονται νέες παραλλαγές, να υπάρξουν αλλαγές στα πρότυπα των συμπτωμάτων που εμφανίζουν τα άτομα. Επομένως, η κλινική διάγνωση θα πρέπει πάντα να επιβεβαιώνεται μέσω εργαστηριακών δοκιμών SARS-CoV-2. Τα πιο κοινά συμπτώματα είναι πυρετός, ρίγη, απώλεια όσφρησης και/ή γεύσης, νέος ή επιδεινούμενος βήχας, κόπωση και μυαλγία, πονοκέφαλος, γαστρεντερικά συμπτώματα (ναυτία, έμετος, διάρροια). Μερικά λιγότερο συχνά συμπτώματα είναι δύσπνοια ή δυσκολία στην αναπνοή, πονόλαιμος, επώδυνη και/ή δυσκολία στην κατάποση, επιπεφυκίτιδα, νέα ή ασυνήθιστη έξαρση χρόνιων καταστάσεων, παραλήρημα, μειωμένη ή απώλεια όρεξης. Τα σπάνια συμπτώματα είναι δερματικές εκδηλώσεις, σύγχυση, καταρροή/βουλωμένη μύτη, εκδηλώσεις στα μάτια²⁸.

Οι ασυμπτωματικοί ασθενείς δεν έχουν κλινικά συμπτώματα και απεικονιστικά ευρήματα θώρακα. Για τους ασθενείς με ήπια έως μέτρια νόσο υπάρχουν κλινικά συμπτώματα, όπως πυρετός, κόπωση, βήχας, ανορεξία, κακουχία, μυϊκός πόνος, πονόλαιμος, δύσπνοια, ρινική συμφόρηση, πονοκέφαλος. Σε αυτά η απεικόνιση του θώρακα μπορεί να δείξει ήπια εκδήλωση πνευμονίας. Οι ασθενείς που πάσχουν από

σοβαρή νόσο εμφανίζονται συμπτώματα λοίμωξης του αναπνευστικού. Επιπλέον μπορεί να εμφανιστεί δύσπνοια, RR ≥ 30 αναπνοές/λεπτό. Σε κατάσταση ηρεμίας ο κορεσμός οξυγόνου είναι $\leq 93\%$. PaO₂/FiO₂ ≤ 300 mmHg (1 mmHg = 0,133 kPa). Η απεικόνιση θώρακα δείχνει ότι οι βλάβες προχώρησαν σημαντικά > 50% εντός 24-48 ωρών. Η κατάσταση είναι κρίσιμη όταν υπάρχει ταχεία εξέλιξη της νόσου και αναπνευστική ανεπάρκεια και είναι αναγκαίος ο μηχανικός αερισμός. Σε συνδυασμό με ανεπάρκεια άλλων οργάνων απαιτείται θεραπεία παρακολούθησης στη ΜΕΘ²⁹.

2. Πρόληψη

Η πρόληψη του ανθρώπου από τον ιό δεν μπορεί να εφαρμοστεί 100%. Παρ' όλα αυτά πρέπει να τηρούνται τα ατομικά μέτρα πρόληψης και να πραγματοποιούνται τα εμβόλια έναντι του ιού για την πιο αποτελεσματική μείωση της εξάπλωσης του.

2.1 Ατομικά μέτρα πρόληψης

Το πιο συχνό και υποχρεωτικό ατομικό μέτρο πρόληψης είναι η χρήση μάσκας σε κλειστούς χώρους και σε χώρους που ο κίνδυνος μετάδοσης του ιού είναι υψηλός. Η χρήση μάσκας προστατεύεται και ο άνθρωπος που την φοράει αλλά και οι γύρω του από αυτόν καθώς ο βήχας και το φτάρνισμα καλύπτονται. Είναι απαραίτητη η αποφυγή της συγχώνευσης ανθρώπων σε κλειστό μη αεριζόμενο εσωτερικό χώρο και η απόσταση μεταξύ τους πρέπει να είναι τουλάχιστον δύο μέτρα. Για την μείωση της εξάπλωσης του ιού πρέπει να διενεργούνται διαγνωστικά tests σε περίπτωση επαφής με επιβεβαιωμένο κρούσμα ή εμφάνισης συμπτωμάτων. Απαιτείται συχνό και σχολαστικό πλύσιμο χεριών, απολύμανση και αερισμός του χώρου. Τέλος, σημαντική είναι η ατομική παρακολούθηση της υγείας για τυχόν εμφάνιση συμπτωμάτων³⁰.

2.2 Εμβόλια

Ο εμβολιασμός είναι μια από τις πιο αποτελεσματικές ιατρικές παρεμβάσεις που έχουν εφαρμοστεί

ποτέ στην ανθρώπινη ιστορία. Τα εμβόλια συμβάλλουν σημαντικά στη μείωση της επιβάρυνσης των μολυσματικών ασθενειών σε πολλές χώρες.

2.2.1 Ανάπτυξη Εμβολίων κατά Covid-19

Όσον αφορά τη νόσο covid-19, είναι σημαντικό να μελετηθούν οι πιθανές αποκρίσεις του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς και ο ρόλος συγκεκριμένων Τ κυττάρων και Β λεμφοκυττάρων κατά τη διάρκεια της μόλυνσης από SARS-CoV-2, προκειμένου να κατανοηθεί η κατάλληλη ανοσολογική απόκριση κατά του SARS-CoV-2 με κατάλληλο τρόπο και να σχεδιαστεί ένα ασφαλές και αποτελεσματικό εμβόλιο³¹. Οι αποκρίσεις αυτές αναλύθηκαν στο κεφάλαιο Α.3 Παθοφυσιολογία και έδειξαν ότι ένας βασικός λόγος θνησιμότητας στους ασθενείς με COVID-19 είναι η λειτουργική εξάντληση και η σημαντική μείωση του αριθμού των Τ κυττάρων που μπορεί να συμβεί μετά την καταιγίδα κυτοκινών³². Τα στοιχεία αυτά υποδηλώνουν ότι τα ειδικά για τον κοροναϊό Τ κύτταρα διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη θανάτωση του ιού καθώς και στην πρόληψη της ανάπτυξης της νόσου, κάτι που είναι ένα σημαντικό σημείο που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στις στρατηγικές εμβολίων³¹. Έχουν μελετηθεί τα ανοσοκυρί-αρχα αντιγόνα SARS-CoV για το σχεδιασμό ενός αποτελεσματικού εμβολίου.

2.2.2 Εμβόλια ικών φορέων (Viral Vector vaccines)

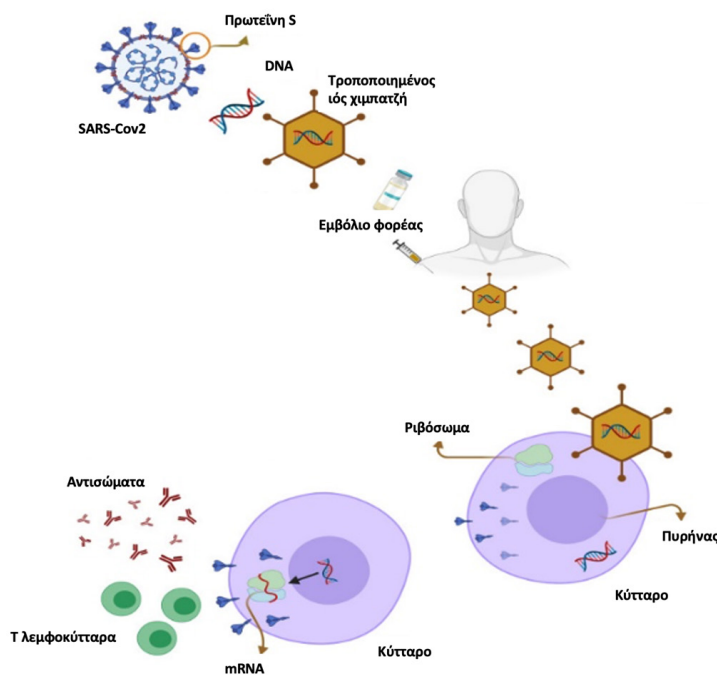
Τα εμβόλια ικών φορέων χρησιμοποιούν μια τροποποιημένη έκδοση ενός διαφορετικού ιού (του φορέα) ο οποίος κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες του κοροναϊού για να δημιουργήσει με ασφάλεια μια ανοσολογική απόκριση³³.

Πρώτον, ο φορέας θα εισέλθει σε ένα κύτταρο στο σώμα και στη συνέχεια θα χρησιμοποιήσει τον μηχανισμό του κυττάρου για να παράγει ένα αβλαβές κομμάτι του ιού που προκαλεί το COVID-19. Αυτό το κομμάτι είναι γνωστό ως πρωτεΐνη ακίδας και βρίσκεται μόνο στην επιφάνεια του ιού που προκαλεί το COVID-19. Στη συνέχεια, το κύτταρο εμφανίζει την πρωτεΐνη ακίδας στην επιφάνειά του και το ανοσο-

ποιητικό σύστημα την αναγνωρίζει ως ξένη. Αυτό ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα να αρχίσει να παράγει αντισώματα και να ενεργοποιεί άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος για να καταπολεμήσει αυτό που πιστεύει ότι είναι λοίμωξη. Στο τέλος της διαδικασίας, ο οργανισμός έχει μάθει πώς να προστατεύεται από μελλοντική μόλυνση με τον ιό που προκαλεί το COVID-19. Το όφελος είναι πως λαμβάνεται αυτή η προστασία από ένα εμβόλιο, χωρίς να χρειαστεί ποτέ να εκτεθεί ο οργανισμός στις σοβαρές συνέπειες της νόσου. Οποιαδήποτε προσωρινή ενόχληση μετά τη λήψη του εμβολίου είναι ένα φυσικό μέρος της διαδικασίας και μια ένδειξη ότι το εμβόλιο λειτουργεί³⁴.

Εν συντομία, τα εμβόλια που βασίζονται σε ιικούς φορείς διαφέρουν από τα περισσότερα συμβατικά εμβόλια στο ότι στην πραγματικότητα δεν περιέχουν αντιγόνα, αλλά χρησιμοποιούν τα ίδια τα κύτταρα του σώματος για την παραγωγή τους. Το κάνουν αυτό χρησιμοποιώντας έναν τροποποιημένο ιό (τον φορέα) για να παραδώσουν γενετικό κώδικα για αντιγόνο, στην περίπτωση πρωτεϊνών ακίδων του COVID-19 που βρίσκονται στην επιφάνεια του ιού, στα ανθρώπινα κύτταρα. Μολύνοντας τα κύτταρα και δίνοντάς τους οδηγίες να παράγουν μεγάλες ποσότητες αντιγόνου, το οποίο στη συνέχεια πυροδοτεί μια ανοσολογική απόκριση, το εμβόλιο μιμείται αυτό που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της φυσικής μόλυνσης με ορισμένα παθογόνα - ειδικά ιούς. Αυτό έχει το πλεονέκτημα ότι πυροδοτεί μια ισχυρή κυτταρική ανοσολογική απόκριση από τα Τ κύτταρα καθώς και την παραγωγή αντισωμάτων από τα Β κύτταρα³⁵.

Ένα από τα εμβόλια ικών φορέων είναι το **AZD1222**. Το Πανεπιστήμιο της Οξφόρδης συνεργάστηκε με τη βρέτανο-σουηδική εταιρεία AstraZeneca για την ανάπτυξη και τη δοκιμή αυτού του εμβολίου κατά του κορωνοϊού. Το εμβόλιο προσφέρει ισχυρή προστασία, με συνολική αποτελεσματικότητα 76%. Βασίζεται στις γενετικές οδηγίες του ιού για την κατασκευή της πρωτεΐνης ακίδας. Το εμβόλιο της Οξφόρδης χρησιμοποιεί δίκλωνο DNA. Έγινε προσθήκη του γονιδίου για την πρωτεΐνη κορωνοϊού σε έναν άλλο ιό που ονομάζεται αδενοϊός. Οι αδενοϊοί είναι κοινοί ιοί που συνήθως προκαλούν κρυολόγημα ή συμπτώματα που μοιάζουν με γρίπη³⁶. Έτσι, η ομάδα



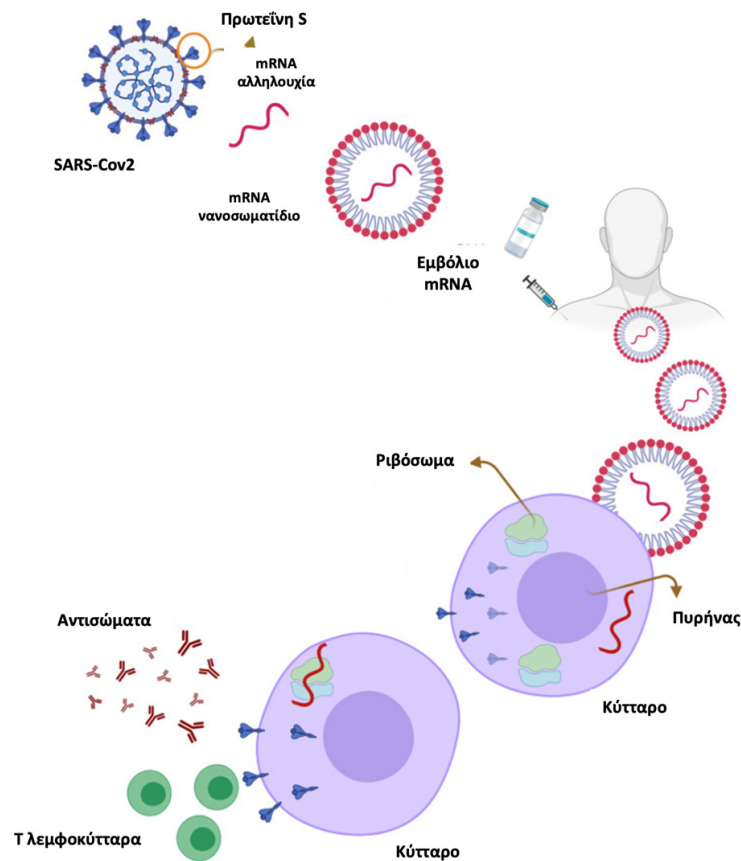
Σχήμα 3: Μηχανισμός δράσης AZD1222 προσαρμοσμένο από την παραπομπή³⁶.

Oxford-AstraZeneca χρησιμοποίησε μια τροποποιημένη έκδοση ενός αδενοϊού χιμπατζή, γνωστού ως ChAdOx1, ο οποίος δεν έχει εκτεθεί σε ανθρώπινους πληθυσμούς και δεν δημιουργεί ανοσολογική απόκριση στον ίδιο τον αδενοϊό, αλλά μόνο στην ιική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται στο DNA του ξενιστή³³.

Εν συντομία, ο αδενοϊός του χιμπατζή εγχέεται στον άνθρωπο και κολλάει στα κύτταρα-ξενιστές. Το DNA απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και αργότερα μεταναστεύει στον πυρήνα του κυττάρου. Δεν ενσωματώνεται στο κυτταρικό DNA, αλλά χρησιμοποιεί τα ένζυμα του ξενιστή για να μετατραπεί σε mRNA που μεταναστεύει πίσω στο κυτταρόπλασμα και αλληλεπιδρά με τα ριβόσωμα του κυττάρου ξενιστή (ελεύθερα ή συνδεδεμένα με το ενδοπλασματικό δίκτυο), καταλήγοντας σε μεταφρασμένες πρωτεΐνες ακίδας³⁶.

Ορισμένες από τις πρωτεΐνες ακίδας που παράγονται από το κύτταρο σχηματίζουν αιχμές που μεταναστεύουν στην επιφάνειά του. Αυτές οι προεξέχουσες αιχμές και θραύσματα πρωτεΐνης ακίδας μπορούν στη συνέχεια να αναγνωριστούν από το

ανοσοποιητικό σύστημα. Έτσι, ενεργοποιούνται τα συστήματα συναγερμού του κυττάρου. Κηρύσσοντας αυτόν τον συναγερμό, το εμβόλιο Oxford-AstraZeneca προκαλεί το ανοσοποιητικό σύστημα να αντιδρά πιο έντονα στις πρωτεΐνες ακίδας. Όταν τα βοηθητικά T κύτταρα ανιχνεύουν τα θραύσματα της πρωτεΐνης, τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα μπορούν να προειδοποιήσουν και να βοηθήσουν στον συντονισμό άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού για την καταπολέμηση της λοίμωξης. Άλλα ανοσοκύτταρα, που ονομάζονται B κύτταρα, μπορεί να προσκρούσουν στις αιχμές του κορωνοϊού στην επιφάνεια των εμβολιασμένων κυττάρων ή σε θραύσματα πρωτεΐνης ακίδας που επιπλέουν ελεύθερα. Μερικά από τα B κύτταρα μπορεί να είναι σε θέση να κλειδώσουν πάνω στις πρωτεΐνες ακίδας. Εάν στη συνέχεια αυτά τα B κύτταρα ενεργοποιηθούν από τα βοηθητικά T κύτταρα, θα αρχίσουν να πολλαπλασιάζονται και να εκκρίνουν αντισώματα που στοχεύουν την πρωτεΐνη ακίδας. Έτσι, τα αντισώματα μπορούν να κολλήσουν στις αιχμές του κορωνοϊού, να ξεκινήσει η καταστροφή του ιού και να αποτρέψουν τη μόλυνση εμποδί-



Σχήμα 4: Μηχανισμός δράσης mRNA εμβολίων προσαρμοσμένο από την παραπομπή³³.

ζοντας τις αιχμές να προσκολληθούν σε άλλα κύτταρα³⁵.

2.2.3 mRNA Εμβόλια

Τα εμβόλια mRNA έχουν μελετηθεί στο παρελθόν για τη γρίπη, τη λύσσα και τον κυτταρομεγαλοϊό (CMV). Το ενδιαφέρον για αυτά τα εμβόλια έχει αυξηθεί επειδή μπορούν να αναπτυχθούν σε εργαστήριο χρησιμοποιώντας άμεσα διαθέσιμα υλικά. Αυτό σημαίνει ότι η διαδικασία μπορεί να τυποποιηθεί και να κλιμακωθεί, καθιστώντας την ανάπτυξη εμβολίων ταχύτερη από τις παραδοσιακές μεθόδους παρασκευής εμβολίων.

Από τον ιό SARS-CoV-2, το mRNA, απομονώνεται και περιλαμβάνεται σε ένα λιπιδικό νανοσωματί-

διο. Αυτό το νανοσωματίδιο εγχέεται ενδομυϊκά στο μυ του άνω βραχίονα και μόλις συνδεθεί στα κύτταρα-ξενιστές, εισάγει το mRNA του στο κυτταρόπλασμα ώστε να φτάσει στα ριβοσώματα και να τα χρησιμοποιήσει για τη σύνθεση των ιικών πρωτεϊνών ακίδας. Αφού γίνει το κομμάτι πρωτεΐνης, το κύτταρο διασπά τις οδηγίες και τις απαλλάσσει. Στη συνέχεια, το κύτταρο εμφανίζει το κομμάτι πρωτεΐνης στην επιφάνειά του. Το ανοσοποιητικό σύστημα αναγνωρίζει ότι η πρωτεΐνη αυτή δεν ανήκει εκεί και αρχίζει να δημιουργεί μια ανοσοαπόκριση και να παράγει αντισώματα, όπως αυτό που συμβαίνει στη φυσική μόλυνση κατά του COVID-19. Στο τέλος της διαδικασίας, ο ανθρώπινος οργανισμός έχει μάθει πώς να προστατεύεται από μελλοντική μόλυνση³⁷.

Τα mRNA εμβόλια δεν επηρεάζουν ούτε αλληλεπι-

δρούν με το DNA με κανέναν τρόπο. Ένα από τα εγκεκριμένα mRNA εμβόλια είναι το **Comirnaty** της Pfizer και BioNTech. Χορηγείται σε άτομα από 12 ετών και άνω ως δύο ενέσεις, συνήθως στον μυ του άνω βραχίονα, με διαφορά 3 εβδομάδων. Δεν περιέχει τον ίδιο τον ιό και δεν μπορεί να προκαλέσει COVID-19³⁸.

Το Comirnaty εργάζεται προετοιμάζοντας το σώμα να αμυνθεί κατά του COVID-19. Περιέχει mRNA το οποίο έχει οδηγίες για την παραγωγή της πρωτεΐνης ακίδας³⁹. Προσφέρει υψηλό επίπεδο προστασίας έναντι του COVID-19 με 95% αποτελεσματικότητα⁴⁰. Οι περισσότερες ανεπιθύμητες ενέργειες είναι ήπιες έως μέτριες σε βαρύτητα και εξαφανίζονται εντός λίγων ημερών. Σε αυτές συγκαταλέγονται πόνος και οίδημα στο σημείο της ένεσης, κόπωση, κεφαλαλγία, πόνος στους μύες και στις αρθρώσεις, ρίγη και πυρετός³⁹.

Το εμβόλιο αποθηκεύεται σε θερμοκρασία -70°C. Ωστόσο, δεν χρησιμοποιούνται ανοσοενισχυτικά ή συντηρητικά επειδή το εμβόλιο διεγείρεται από μόνο του. Επιπλέον, ένα σωματίδιο λιπιδίου περιλαμβάνει το mRNA. Το σωματίδιο το διατηρεί την ακεραιότητά του και επιτρέπει στο mRNA να μην συγχέεται με άλλα μόρια RNA³³.

2.2.4 Εμβόλια Πρωτεϊνικής Υπομονάδας (Protein Subunit Vaccines)

Αντί να εγχέεται ένα ολόκληρο παθογόνο για να προκαλέσει μια ανοσολογική απόκριση, τα εμβόλια υπομονάδας περιέχουν καθορισμένα κομμάτια του, τα οποία έχουν επιλεγεί ειδικά για την ικανότητά τους να διεγείρουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Επειδή αυτά τα θραύσματα δεν είναι ικανά να προκαλέσουν ασθένεια, τα εμβόλια υπομονάδας θεωρούνται πολύ ασφαλή. Τα εμβόλια υπομονάδας πρωτεΐνης περιέχουν συγκεκριμένες απομονωμένες πρωτεΐνες από ιικούς ή βακτηριακούς παθογόνους παράγοντες. Τα εμβόλια πολυσακχαριτών περιέχουν αλυσίδες μορίων σακχάρου, πολυσακχαρίτες, που βρίσκονται στα κυτταρικά τοιχώματα ορισμένων βακτηρίων. Τα εμβόλια συζευγμένης υπομονάδας δεσμεύουν μια αλυσίδα πολυσακχαρίτη σε μια πρωτεΐνη φορέα για να προσπαθήσουν να ενισχύσουν την ανοσολογική απόκριση.

Μόνο εμβόλια πρωτεϊνικής υπομονάδας αναπτύσ-

ονται κατά του ιού που προκαλεί το COVID-19. Αυτά περιέχουν θραύσματα πρωτεΐνης και/ή πολυσακχαρίτη από το παθογόνο, τα οποία έχουν μελετηθεί προσεκτικά για να προσδιοριστεί ποιοι συνδυασμοί αυτών των μορίων είναι πιθανό να παράγουν ισχυρή και αποτελεσματική ανοσολογική απόκριση. Περιορίζοντας την πρόσβαση του ανοσοποιητικού συστήματος στο παθογόνο με αυτόν τον τρόπο, ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος παρενεργειών. Τέτοια εμβόλια είναι επίσης σχετικά φθηνά και εύκολα στην παραγωγή, και πιο σταθερά από εκείνα που περιέχουν ολόκληρους ιούς ή βακτήρια⁴¹.

Επειδή περιέχουν μόνο ένα μέρος του παθογόνου, τα εμβόλια υπομονάδας έχουν συνήθως λιγότερες παρενέργειες και μπορούν να χορηγηθούν σε μια ευρύτερη ομάδα ανθρώπων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα και χρόνιες παθήσεις υγείας⁴². Επειδή τα αντιγόνα δεν μολύνουν τα κύτταρα, τα εμβόλια υπομονάδας πυροδοτούν κυρίως ανοσοαποκρίσεις που προκαλούνται μόνο από αντισώματα. Αυτό σημαίνει ότι η ανοσολογική απόκριση μπορεί να είναι πιο αδύναμη από ό,τι με άλλους τύπους εμβολίων. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, μερικές φορές χορηγούνται εμβόλια υπομονάδας μαζί με ανοσοενισχυτικά, δηλαδή παράγοντες που διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα, και μπορεί να απαιτούνται αναμνηστικές δόσεις.

Όλα τα εμβόλια υπομονάδας παρασκευάζονται χρησιμοποιώντας ζωντανούς οργανισμούς, όπως βακτήρια και ζυμομύκητες, οι οποίοι απαιτούν υποστρώματα για την ανάπτυξή τους και αυστηρή υγιεινή για την αποφυγή μόλυνσης με άλλους οργανισμούς. Αυτό τα καθιστά πιο ακριβά στην παραγωγή τους από τα εμβόλια χημικής σύνθεσης, όπως τα εμβόλια RNA⁴¹.

Ένα βασικό πλεονέκτημα των εμβολίων υπομονάδας έναντι των γενετικών εμβολίων είναι το ισχυρό προφίλ σταθερότητάς τους. Η μεταφορά και η αποθήκευση μπορούν να πραγματοποιηθούν σε κανονικές θερμοκρασίες ψύξης και δεν υπάρχει ανάγκη για υπερψυχρούς καταψύκτες⁴².

Το εμβόλιο **NVX-CoV2373** της εταιρείας Novavax κατά του COVID-19, χρησιμοποιεί μια βελτιστοποιημένη έκδοση της πρωτεΐνης ακίδας πλήρους μήκους

(S) από το SARS-CoV-2 ως αντιγόνο υπομονάδας. Αυτό το αντιγόνο δεν μπορεί να προκαλέσει ασθένεια, αλλά χορηγείται με τρόπο που διαβάζεται για να είναι αναγνωρίσιμο από το ανοσοποιητικό σύστημα.

Το **NVX-CoV2373** αναπτύχθηκε από κοινού από την αμερικανική βιοτεχνολογία Novavax και το ίδρυμα Coalition for Epidemic Preparedness Innovations και έχει λάβει άδεια χρήσης έκτακτης ανάγκης στην Ινδονησία. Το εμβόλιο ανασυνδυασμένης υπομονάδας παρήχθη στο σύστημα έκφρασης κυττάρων εντόμου βακουλοϊού Sf9. Περιέχει 5μg την πλήρους μήκους γλυκοπρωτεΐνη S που έχει σταθεροποιηθεί στη διαμόρφωση πρόγχυσης με 50μg ανοσοενισχυτικό Matrix-M™ με βάση τη σαπωνίνη.^{43, 44} Αυτό το αντιγόνο δεν μπορεί να προκαλέσει ασθένεια, αλλά χορηγείται με τρόπο που διαβάζεται για να είναι αναγνωρίσιμο από το ανοσοποιητικό σύστημα⁴².

Κλινικές δοκιμές έδειξαν ότι το NVX-CoV2373 παρέχει διασταυρούμενη προστασία έναντι των παραλλαγών Βήτα του SARS-CoV-2⁴⁵. Στην πραγματικότητα, το ανασυνδυασμένο εμβόλιο είναι 51% αποτελεσματικό έναντι του B.1.351 σε εθελοντές αρνητικούς στον HIV. Επιπλέον, κλινικές δοκιμές Φάσης 3 έδειξαν ότι το Novavax παρείχε 96,4% προστασία έναντι του συμπτωματικού Covid-19 και 86,3% έναντι της παραλλαγής Alpha⁴⁴.

2.2.5 Εμβόλια Αδρανοποιημένου Ιού

Ένα αδρανοποιημένο εμβόλιο περιέχει πλήρεις ιούς που έχουν σκοτωθεί από χημικές ουσίες, ακτινοβολία ή θερμότητα και δεν μπορούν να προκαλέσουν την ασθένεια⁴⁶. Η ανάπτυξη αυτού του τύπου εμβολίου απαιτεί ειδικές εργαστηριακές εγκαταστάσεις για την ασφαλή ανάπτυξη του ιού, μέσω μιας μακροχρόνιας διαδικασίας παραγωγής, και απαιτούνται δύο ή τρεις δόσεις για αποτελεσματική χορήγηση. Τα επί του παρόντος διαθέσιμα εμβόλια γρίπης και πολιομυελίτιδας είναι παραδείγματα αυτού του τύπου εμβολίων⁴³.

Το Sinopharm BBIBP-CoV είναι ένα αδρανοποιημένο υποψήφιο εμβόλιο που παράγεται από το Ινστιτούτο Βιολογικών Προϊόντων της Sinopharm στο Πεκίνο. Ένα δείγμα του ιού WT (στέλεχος HB02)

καλλιεργήθηκε σε κύτταρα Vero, αδρανοποιήθηκε χημικά από β-προπιολακτόνη και στη συνέχεια αναμίχθηκε με ένα ανοσοενισχυτικό με βάση το αλουμίνιο⁴⁷.

Μια ενδιάμεση ανάλυση της μελέτης φάσης 3 έδειξε ότι το εμβόλιο ήταν 78,1% αποτελεσματικό κατά συμπτωματικά κρούσματα Covid-19⁴⁸. Μια ερευνητική μελέτη που διεξήχθη με 282 άτομα από τη Σρι Λάνκα που έλαβαν το παρασκεύασμα εμβολίου έδειξε 10πλάσια μείωση στους τίτλους εξουδετερωτικών αντισωμάτων (nAb) έναντι του Beta και 1,38 φορές μείωση έναντι του Delta, σε σύγκριση με την αναφορά στέλεχος⁴³.

3. Φάρμακα

3.1 Γενικά

Υπάρχουν πολλές πιθανές προσεγγίσεις για την φαρμακολογική καταπολέμηση του COVID-19 όπως φάρμακα μικρού μορίου, θεραπείες με ιντερφερόνη, εμβόλια, ολιγονουκλεοτίδια, πεπτιδία και μονοκλωνικά αντισώματα. Εδώ θα αναλυθούν ορισμένα εγκεκριμένα φάρμακα και μονοκλωνικά αντισώματα⁴⁹.

Τα φάρμακα που μπορούν να δράσουν σε έναν κοροναϊό κατηγοριοποιούνται με βάση τους μηχανισμούς δράσης τους. Χωρίζονται σε αυτά που δρουν στις πρωτεΐνες και τα ένζυμα του ιού εμποδίζοντας έτσι την αντιγραφή και τη σύνθεση του RNA, σε αυτά που δρουν στις δομικές πρωτεΐνες του ιού, με αναστολή αυτοσυναρμολόγησης ή παρεμπόδιση της πρόσδεσης του ιού σε ACE2 και σε εκείνα που δρουν σε παράγοντες λοίμωξης δράσης και μπορούν να διευκολύνουν την αποκατάσταση της έμφυτης ανοσίας του ξενιστή. Επιπλέον, υπάρχουν φάρμακα τα οποία μπορούν να δράσουν σε ανθρώπινα ένζυμα ή υποδοχείς, εμποδίζοντας έτσι την είσοδο του ιού⁴⁹.

Γενικά, διερευνώνται δύο διακριτές προσεγγίσεις για την επαναχρησιμοποίηση των συμβατικών φαρμάκων και την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών φαρμάκων έναντι της νόσου COVID-19. Πρόκειται για την πρόληψη της εισόδου του ιού στα κύτταρα ξενιστές και την καταστολή διαφόρων σταδίων στην αντιγραφή του ιού μέσα στα κύτταρα. Η αποτελεσματικότητα διάφορων αντικικών θεραπειών που

είναι ικανά να περιορίσουν ή ακόμα και να αποτρέψουν την δέσμευση του ιού στους υποδοχείς ACE2 μειώνεται για ορισμένους λόγους. Τα εγγενή μιμητικά, τα αντισώματα και τα θραύσματά τους διαθέτουν σχετικά χαμηλή σταθερότητα στην κυκλοφορία του αίματος και μπορεί να μειώσουν την ειδική δραστηριότητά τους κατά τη μεταφορά τους στους κύριους στόχους τους⁵⁰.

Οι πιο αποτελεσματικοί τρόποι για την προστασία του θεραπευτικού ωφέλιμου φορτίου από την αποικοδόμηση στην κυκλοφορία του αίματος περιλαμβάνουν τη σύζευξή τους με νανοσωματίδια και την παροχή ειδικά στο σημείο δράσης. Στην περίπτωση του COVID-19 και άλλων ιών SARS, η εισπνοή αντισωμάτων ACE2 από νανοσωματίδια ειδικά στους πνεύμονες είναι ικανή όχι μόνο να τα παραδώσει όσο το δυνατόν πιο κοντά στους στοχευμένους κυτταρικούς υποδοχείς και να διατηρήσει την ειδική τους δραστηριότητα, αλλά και να περιορίσει σημαντικά την αδρανοποίηση των υποδοχέων ACE2 σε άλλα μη στοχευμένα όργανα περιορίζοντας πιθανές ανεπιθύμητες παρενέργειες της θεραπείας. Άλλοι περιορισμοί περιλαμβάνουν πιθανή σύνδεση φαρμάκων σε θέσεις στους υποδοχείς ACE2 ή στα RBD που δεν ανταγωνίζονται ή παρεμβαίνουν στην είσοδο του ιού. Η ισχύς τέτοιων θεραπευτικών ουσιών μπορεί να βελτιωθεί με την ενίσχυση της συγγένειας δέσμευσής τους έναντι του επίτοπου του RBD⁵¹.

Σε αντίθεση με τους αναστολείς του υποδοχέα ACE2, το μεγαλύτερο μέρος των επαναχρησιμοποιούμενων αντι-COVID-19 φαρμάκων δεν αλληλεπιδρούν με την είσοδο του ιού στα κύτταρα-ξενιστές. Αντίθετα, τα φάρμακα εμποδίζουν ένα ή περισσότερα στάδια αναπαραγωγής του ιού μέσα στο κύτταρο. Τα φάρμακα μπορεί να αποτρέψουν την ενδοκυττάρωση (π.χ. χλωροκίνη, ναφαμοστάτη, γριφιθίνη), να αναστείλουν την ωρίμανση των ενδοσωμάτων (π.χ. υδροξυχλωροκίνη, απιλιμόδη, κολχικίνη, βινορελβίνη) και την απελευθέρωση ιικού γονιδιώματος (π.χ. κινανσερίνη, δισουλφιδάμη) και την αντιγραφή και μετάφραση ιού, αλλά και την μεταγραφή ικών πρωτεϊνών (π.χ. μπανανίνη, 5-υδροξυχρωμόνη, ρεμδεσιβίρη, φαβιπιραβίρη, ριμπαβιρίνη). Θεραπευτικά που βασίζονται σε siRNA και ορισμένα φάρμακα επαναχρησιμοποίησης μπορούν επίσης να χρησιμο-

ποιηθούν για την πρόληψη του σχηματισμού θυγατρικού ιού και την απελευθέρωσή του από το κύτταρο ξενιστή με εξωκυττάρωση⁵².

3.2 Επαναστόχευση Φαρμάκων

3.2.1 Remdesivir

Το Remdesivir, το οποίο αρχικά αναπτύχθηκε για τη θεραπεία του ιού Έμπολα και στη συνέχεια έπεσε, χρησιμοποιείται ως ερευνητικό φάρμακο για ασθενείς με COVID-19⁵¹. Το Remdesivir εμφανίζει επίσης αντική δράση έναντι άλλων τύπων ιών RNA, όπως οι MERS-CoV και SARS-CoV⁵².

Είναι ένα ανάλογο 1 β -κυανο-υποκατεστημένης αδενοσίνης, ένα φωσφοραμιδικό προφάρμακο και ένας εξαρτώμενος από RNA αναστολέας RNA Πολυμεράσης (RdRp) που δρα αναστέλλοντας τη σύνθεση ιικού νουκλεϊκού οξέος μέσω σχηματισμού δεσμού με την ενεργή θέση του RdRp⁴⁹. Το RdRp είναι μια πρωτεΐνη που μεσολαβεί στην αντιγραφή του RNA από ένα ενδιάμεσο εκμαγείο⁵³. Ένας άλλος μηχανισμός δράσης του Remdesivir περιλαμβάνει την αποφυγή διόρθωσης από την εξοριβονουκλεάση του SRS-CoV-2. Ως αποτέλεσμα, η μεταγραφή του ιικού RNA διακόπτεται πρόωρα⁵⁴. Παρόλο που δεν έχουν ακόμη τεκμηριωθεί εκτεταμένες αλληλεπιδράσεις φαρμάκων και καρδιαγγειακές τοξικότητες, υπήρξαν περιπτώσεις υπότασης με επακόλουθη καρδιακή ανακοπή μετά από δόση φόρτωσης σε έναν ασθενή (μεταξύ 175 συνολικά) μετά τη χρήση του remdesivir κατά την επιδημία Έμπολα⁵⁵. Την 1η Μαΐου 2020, ο Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων ενέκρινε μια άδεια χρήσης έκτακτης ανάγκης (EUA) για το Remdesivir με βάση τα προκαταρκτικά κλινικά δεδομένα που υποδεικνύουν γρήγορη ανάρρωση των ασθενών με COVID-19.

3.2.2 Chloroquine

Η χλωροκίνη είναι ένα μικρομοριακό φάρμακο κατηγορίας αμινοκινολίνης, το οποίο χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ελονοσίας. Η χλωροκίνη επαναχρησιμοποιήθηκε επίσης για τη θεραπεία άλλων ασθενειών όπως ο HIV και η ρευματοειδής αρθρίτιδα⁵⁶.

Αυτό το φάρμακο δυνητικά μπορεί να έχει ένα ευρύ φάσμα αντιϊκής δράσης σε όλα τα στάδια της εισόδου και της αναπαραγωγής του ιού⁵⁷. Πρόσφατα, ο FDA εξέδωσε άδεια χρήσης έκτακτης ανάγκης για τη χλωροκίνη για τη θεραπεία του COVID-19⁵⁸.

Έχει υποστηριχθεί ότι η χλωροκίνη αναστέλλει τα ιικά σωματίδια από τη σύνδεση με τον υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας, εμποδίζοντας έτσι την ιική φάση προ-εισόδου του COVID-19. Το φάρμακο δρα στην αναγωγή κίνησης 2, η οποία σχετίζεται δομικά με τις 2-επιμεράσεις UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνης (UNEs). Τα UNEs καταλύουν τη βιοσύνθεση του σιαλικού οξέος. Τα σιαλικά οξέα είναι δομικά συστατικά των μορίων σακχάρου που είναι διαθέσιμα στις κυτταρικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και αυτοί είναι κρίσιμοι παράγοντες που απαιτούνται για την αναγνώριση των προσδεμάτων⁵⁷.

Τελευταίες μελέτες δείχνουν ότι η χλωροκίνη αναστέλλει τη διαδικασία γλυκοζυλίωσης του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης 2 (ACE2)⁵⁸. Η χλωροκίνη μπορεί επίσης να επηρεάσει την εξαρτώμενη από το pH εισχώρηση των ιών SARS-CoV που προκαλείται από το ενδοσώμα. Το όξινο pH είναι απαραίτητο για τη σύντηξη των ενδοσωμικών και ιικών μεμβρανών που οδηγεί στην κυτταροπλασματική παροχή του γονιδιώματος SARS-CoV⁴⁹. Χωρίς αντιϊκό φάρμακο, ο ιός εισέρχεται στο λυσόσωμα όπου η ενζυματική δραστηριότητα καθώς και το χαμηλό pH διασπούν τα σωματίδια του ιού και απελευθερώνουν ένζυμα αντιγραφής μαζί με το RNA. Ο μηχανισμός της αντιϊκής δράσης από τη χλωροκίνη θεωρείται ότι συνεπάγεται την ταχεία αύξηση του ενδοσωμικού pH, την πρόληψη της ενδοκυττάρωσης και τη διακοπή της σύντηξης ενδοσωμάτων-ιού^{57, 59}.

3.2.3 Favipiravir

Το Favipiravir (FVP) είναι ένα άλλο φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη διαχείριση του COVID-19. Αν και ο ειδικός μηχανισμός δράσης κατά του SARS-CoV-2 δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί, το φάρμακο εντοπίζεται γρήγορα ως υπόστρωμα της ιικής πολυμεράσης RNA μετά τη μετατροπή σε ενεργή φωσφοριβοσυλι-

ωμένη κατάσταση⁵³. Το φάρμακο μπλοκάρει τη σύνθεση του ιικού γονιδιωματικού RNA ως τερματιστής της αλυσίδας⁶⁰. Το FVP ή αλλιώς η 6-φθορο-3-υδροξυ-2-πυραζινοκαρβοξαμίδα είναι ένα από του στόματος παράγωγο πυραζινοκαρβοξαμίδης και ανάλογο γουανίνης που αποκλείει ισχυρά και επιλεκτικά την εξαρτώμενη από RNA πολυμεράση (RdRp) των ιών RNA⁶¹. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι, ως προφάρμακο, το FPV αναστέλλει αποτελεσματικά τη μόλυνση SARS-CoV-2 στα κύτταρα Vero E6⁴⁹.

3.2.4 Ivermectin

Το Ivermectin είναι ένα αντιπαρασιτικό και αντιϊκό φάρμακο εγκεκριμένο από τον FDA για τη θεραπεία παρασιτικών σκουληκιών, HIV και δάγκειου πυρετού. Καταστέλλει τις κυτταρικές διεργασίες του ξενιστή αναστέλλοντας τη μεταφορά της πυρηνικής ενέργειας από την importin $\alpha/\beta 1$, οδηγώντας έτσι σε μείωση της αντιγραφής του ιού⁶². Το Ivermectin αναστέλλει επίσης την αντιγραφή του SARS-CoV-2 *in vitro* και μια εφάπαξ δόση μπορεί να οδηγήσει σε μείωση ~ 5000 φορές του ιικού RNA στις 48 ώρες⁶³. Το φάρμακο βρίσκεται επίσης σε κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία του COVID-19. Μια πρόσφατη αναδρομική μελέτη παρατήρησης ασθενών με COVID-19 ανέφερε σημαντικά χαμηλότερη θνησιμότητα με θεραπεία με ιβερμεκτίνη⁶⁴.

3.2.5 Lopinavir/Ritonavir

Ο συνδυασμός Lopinavir/Ritonavir είναι ένας ευρέως συζητημένος συνδυασμός αντιϊών που πιστεύεται ότι έχει μια πολλά υποσχόμενη ισχύ στη θεραπεία του COVID-19.

Το Lopinavir είναι αναστολέας πρωτεάσης και είναι γνωστό ότι μειώνει το ιικό φορτίο αποτρέποντας τον ιικό πολλαπλασιασμό στα κύτταρα-ξενιστές⁶⁵, ενώ το ritonavir χρησιμοποιείται με lopinavir για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας και του χρόνου ημιζωής του lopinavir αναστέλλοντας το κυτόχρωμα p450⁶⁶. Αυτή η συνδυαστική θεραπεία είχε προηγουμένως καταχωρηθεί για τη θεραπεία της λοίμωξης HIV και MERS, η οποία βρέθηκε ότι είναι ισχυρή στην αναστολή του SARS-CoV⁶⁷.

3.2.6 Arbidol

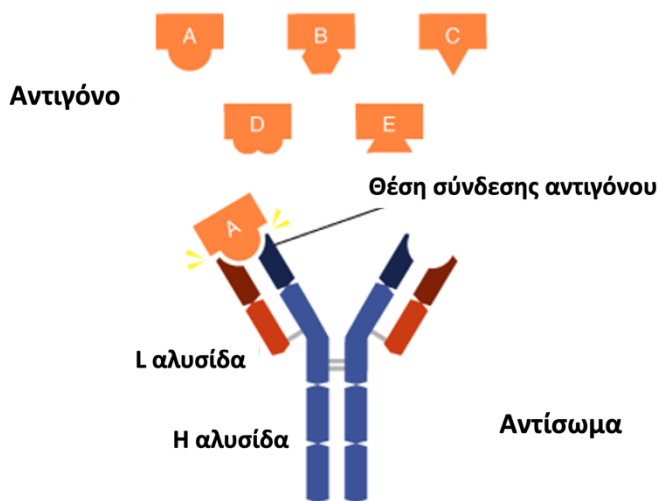
Το Arbidol είναι ένα μικρό παράγωγο ινδόλης με άδεια χρήσης στην Κίνα και τη Ρωσία ως προφυλακτικός και θεραπευτικός παράγοντας για τη θεραπεία λοιμώξεων από τη γρίπη Α και Β μαζί με άλλες ιογενείς λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος⁶⁸.

Το Arbidol ασκεί την αντικική του δράση αναστέλλοντας τη σύντηξη του ιικού περιβλήματος με τη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή μέσω της αναστολής της ενδοκυττάρωσης, αποτρέποντας έτσι την είσοδο του ιού στα κύτταρα ξενιστές⁶⁵. Λόγω των ευρέως φάσματος αντικικών δραστηριοτήτων της, το Arbidol βρέθηκε να έχει κάποια ισχύ στη θεραπεία του COVID-19 μέσω κάποιων κλινικών μελετών μικρού μεγέθους. Υπάρχει μικρό όφελος από τη θεραπεία με arbidol στον ρυθμό και τη διάρκεια της αρνητικής μετατροπής του νουκλεϊκού οξέος SARS-CoV-2 μαζί με το ρυθμό κλινικής βελτίωσης και απεικόνισης θώρακα⁶⁹. Σε αντίθεση με αυτήν τη μελέτη, μια αναδρομική μελέτη διαπίστωσε ότι η θεραπεία με arbidol θα μπορούσε να βελτιώσει τα συμπτώματα, την απεικόνιση του θώρακα, την κάθαρση του ιού και το ποσοστό εξόδου από το νοσοκομείο καθώς και το ποσοστό θνησιμότητας μεταξύ των ασθενών με COVID-19⁷⁰. Ομοίως, σε άλλη μελέτη βρέθηκε το Arbidol ως ανώτερος θεραπευτικός παράγοντας στην αρνητική μετατροπή ασθενών για νουκλεϊκό οξύ SARS-CoV-2 και έχει μικρότερη διάρκεια θετικού τεστ RNA έναντι της θεραπείας με λοπιναβίρη/ριτοναβίρη⁷¹.

4. Αντισώματα

Ο όρος «αντίσωμα» χρονολογείται από το 1901. Πριν από εκείνη την εποχή, ένα «αντίσωμα» αναφερόταν σε οποιαδήποτε από μια σειρά διαφορετικών ουσιών που χρησίμευαν ως «σώματα» για την καταπολέμηση της μόλυνσης και των αρνητικών συνεπειών της⁷². Τα αντισώματα είναι αποσπάσματα πρωτεΐνης τα οποία παράγονται από τα κύτταρα του πλάσματος ως απόκριση σε ένα αντιγόνο δηλαδή σε μια ουσία που προκαλεί το σώμα να κάνει μια συγκεκριμένη ανοσολογική απόκριση.

Αφού εισβάλει ένας ιός σε ένα κύτταρο, ακολουθεί μια σειρά από γεγονότα όπου τα Β κύτταρα του



Σχήμα 5: Σύνδεση αντισώματος-αντιγόνου προσαρμοσμένο από την παραπομπή⁷².

ανοσοποιητικού συστήματος μεταμορφώνονται σε πλασματοκύτταρα και αρχίζουν να παράγουν αντισώματα. Κάθε Β κύτταρο δημιουργεί εκατομμύρια αντίγραφα ενός και μόνο αντισώματος. Όποτε είναι αναγκαίο, κάθε Β κύτταρο θα διαιρείται σε δύο θυγατρικά Β κύτταρα που είναι ουσιαστικά κλώνοι του γονέα. Αυτοί οι κλώνοι παράγουν το ίδιο αντίσωμα. Τα αντισώματα δεσμεύονται σε συγκεκριμένα μέρη του ιού, αναγνωρίζοντας διαφορετικούς στόχους στο σωματίδιο του ιού. Αυτή η απόκριση ονομάζεται πολυκλωνική. Ο σκοπός αυτής της δέσμευσης είναι να βοηθήσει στην καταστροφή του αντιγόνου. Ορισμένα αντισώματα καταστρέφουν τα αντιγόνα άμεσα. Άλλα διευκολύνουν τα λευκά αιμοσφαίρια να καταστρέψουν το αντιγόνο. Εάν ένα αντίσωμα κολλήσει σε ένα μέρος του ιού με τρόπο που το εμποδίζει να εισέλθει στο κύτταρο τότε ονομάζονται εξουδετερωτικό αντίσωμα^{73,74}. Μερικά αντισώματα είναι αυτοαντισώματα και στρέφονται ενάντια στους δικούς μας ιστούς⁷².

Τα ανθρώπινα αντισώματα ταξινομούνται σε πέντε ισότυπους (IgM, IgD, IgG, IgA και IgE) σύμφωνα με τις Η αλυσίδες τους, οι οποίες παρέχουν σε κάθε ισότυπο ξεχωριστά χαρακτηριστικά και ρόλους. Το IgG είναι ο πιο άφθονος ισότυπος αντισώματος στο αίμα (πλάσμα), που αντιπροσωπεύει το 70-75% των

ανθρώπινων ανοσοσφαιρινών (αντισωμάτων). Το IgG αποτοξινώνει επιβλαβείς ουσίες και είναι σημαντικό για την αναγνώριση συμπλεγμάτων αντιγόνου-αντισώματος από λευκοκύτταρα και μακροφάγα. Το IgG μεταφέρεται στο έμβρυο μέσω του πλακούντα και προστατεύει το βρέφος μέχρι να λειτουργήσει το δικό του ανοσοποιητικό σύστημα. Το IgM αντιπροσωπεύει περίπου το 10% των ανθρώπινων ανοσοσφαιρινών και κυκλοφορεί συνήθως στο αίμα. Το IgM έχει μια πενταμερή δομή στην οποία πέντε βασικά μόρια σχήματος Y συνδέονται μεταξύ τους. Τα B κύτταρα παράγουν πρώτα IgM ως απόκριση σε μικροβιακή μόλυνση/εισβολή αντιγόνου. Αν και το IgM έχει χαμηλότερη συγγένεια για τα αντιγόνα από το IgG, έχει μεγαλύτερη απληστία για αντιγόνα λόγω της πενταμερούς/εξαμερικής δομής του. Το IgM, όταν δεσμεύεται στον υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας, ενεργοποιεί επίσης τις οδούς κυτταρικής σηματοδότησης. Το IgA είναι άφθονο στον ορό, τη ρινική βλέννα, το σάλιο, το μητρικό γάλα και το εντερικό υγρό, αντιπροσωπεύοντας το 10-15% των ανθρώπινων ανοσοσφαιρινών. Το IgA σχηματίζει διμερή (δηλαδή, δύο μονομερή IgA ενωμένα μεταξύ τους). Η IgA στο μητρικό γάλα προστατεύει τη γαστρεντερική οδό των νεογνών από παθογόνα. Η IgE υπάρχει σε ελάχιστες ποσότητες, αντιπροσωπεύοντας όχι περισσότερο από το 0,001% των ανθρώπινων ανοσοσφαιρινών. Ο αρχικός του ρόλος είναι να προστατεύει από τα παράσιτα. Σε περιοχές όπου η παρασιτική μόλυνση είναι σπάνια, η IgE εμπλέκεται κυρίως στην αλλεργία. Η IgD αντιπροσωπεύει λιγότερο από το 1% των ανθρώπινων ανοσοσφαιρινών. Η IgD μπορεί να εμπλέκεται στην επαγωγή της παραγωγής αντισωμάτων στα B κύτταρα, αλλά η ακριβής λειτουργία της παραμένει άγνωστη⁷⁵.

4.1 Μονοκλωνικά Αντισώματα

Τα μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) είναι φάρμακα. Αποτελούνται από ένα (μονο-) εξουδετερωτικό αντίσωμα που αντιγράφηκε δηλαδή κλωνοποιήθηκε σε εργαστήριο και ερευνήθηκε για χρησιμότητα έναντι μιας συγκεκριμένης ασθένειας ή πάθησης. Τα φάρμακα μονοκλωνικών αντισωμάτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ενισχύσουν την απόκριση του

ανοσοποιητικού συστήματος ή να το ηρεμήσουν μόνα τους ή σε συνδυασμό με άλλα μονοκλωνικά αντισώματα⁷⁴.

Χρησιμοποιούνται για τη σύνδεση με μια συγκεκριμένη ουσία στο σώμα. Κατά τη σύνδεση λοιπόν με τον συγγενή τους επίτοπο στα αντιγόνα-στόχους, τα mAbs μπορούν να μεσολαβήσουν πολλαπλά αποτελέσματα όπως διακοπή της λειτουργίας του στοχευόμενου αντιγόνου και εξάλειψη κυττάρων ή παθογόνων. Σε πολλές περιπτώσεις, η λειτουργία των mAbs διαμεσολαβείται όχι μόνο από τη δέσμευση στο αντιγόνο στόχο από το θραύσμα δέσμευσης αντιγόνου (Fab) αλλά και από τη στρατολόγηση ανοσοκυττάρων ή συμπληρώματος ορού μέσω του τμήματος που μπορεί να κρυσταλλωθεί θραύσμα (Fc), γνωστό ως τελεστικές λειτουργίες⁷⁶.

Επιπλέον, η δέσμευση αυτή είναι πολύ ευέλικτη και μπορεί να μιμηθεί, να μπλοκάρει ή να προκαλέσει αλλαγές για τη θέσπιση ακριβών μηχανισμών και να παρέχει μια αποτελεσματική θεραπευτική παρέμβαση με μια πολύ ειδική θεραπεία για ασθένειες⁷⁷. Τα αντισώματα παθητικής ανοσοποίησης που μπορούν να ανιχνεύσουν την περιοχή του επιτόπου από ξένα σωματίδια του ιού, μπορούν να μειώσουν τον πολλαπλασιασμό του ιού και τη σοβαρότητα της νόσου⁷⁸.

Αυτές οι γενικές έννοιες ισχύουν για τα αντιικά εξουδετερωτικά mAb που δρουν μέσω πολλαπλών μηχανισμών. Τα εξουδετερωτικά αντισώματα μπορούν να είναι αποτελεσματικά in vivo στοχεύοντας ελεύθερους ιούς και μολυσμένα από ιούς κύτταρα μέσω μιας σειράς μηχανισμών. Κάποιοι από αυτούς τους μηχανισμούς είναι:

- Ο άμεσος αποκλεισμός της εισόδου του ιού (εξουδετέρωση)
- Ο άμεσος αποκλεισμός των λειτουργιών τελεστών που προκαλούνται από mAbs
- Ο έμμεσος αποκλεισμός της εισόδου του ιού με διασταυρούμενη σύνδεση ισσωμάτων
- Η αδρανοποίηση της γλυκοπρωτεΐνης εισόδου του ιού (π.χ. μίμηση υποδοχέα) αποτρέποντας την έξοδο του ιού από μολυσμένα κύτταρα
- Η εμπόδιση της εξάπλωσης του ιού από κύτταρο σε κύτταρο (π.χ. παρεμπόδιση του σχηματισμού κυτταρικών συγκυτίων)⁷⁹.

Τα mAbs έχουν φέρει επανάσταση στην θεραπεία

πολλών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου και της αυτοανοσίας, των φλεγμονωδών καταστάσεων, και αντιπροσωπεύουν ένα νέο σύνορο για τη θεραπεία μολυσματικών ασθενειών.

4.2 Μονοκλωνικά Αντισώματα και COVID-19

Κατά τη διάρκεια των δύο περασμένων ετών, αναπτύχθηκε ένας άνευ προηγουμένου μεγάλος αριθμός mAbs για την καταπολέμηση της νόσου του κοροναϊού 2019 (COVID-19). Όσον αφορά τις ομοιότητες μεταξύ του SARS-CoV-2 και του SARS-CoV, αρκετές μελέτες έχουν προτείνει τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων SARS σε ασθενείς με SARS-CoV-2. Τα περισσότερα μονοκλωνικά αντισώματα έχουν εντοπιστεί για την αναγνώριση του θραύσματος S1 του SARS-CoV και ο τομέας σύνδεσης υποδοχέα (RBD) στην υπομονάδα S1 είναι ο πιο σημαντικός στόχος για τον SARS-CoV-2, καθώς τα μονοκλωνικά αντισώματα μπορούν να εμποδίσουν την αλληλεπίδραση του RBD και του ACE2 του υποδοχέας⁸⁰.

Όταν χρησιμοποιούνται mAbs anti-SARS-CoV-2, η θεραπεία θα πρέπει να ξεκινά το συντομότερο δυνατό αφού ο ασθενής λάβει θετικό διαγνωστικό αποτέλεσμα και εντός 10 ημερών από την έναρξη των συμπτωμάτων. Επί του παρόντος, 3 προϊόντα μονοκλωνικών αντισωμάτων έχουν εγκρίνει τη χρήση για τον COVID-19.

4.3 Bamlanivimab και Etesevimab

Το bamlanivimab ήταν το πρώτο μονοκλωνικό αντίσωμα που έλαβε άδεια χρήσης έκτακτης ανάγκης από τον FDA τον Νοέμβριο του 2020 για τη θεραπεία ήπιας έως μέτριας βαρύτητας COVID-19 σε ασθενείς με υψηλό κίνδυνο να αναπτύξουν σοβαρή νόσο. Είναι ένα εξουδετερωτικό μονοκλωνικό αντίσωμα ανθρώπινου IgG1κ που στοχεύει την πρωτεΐνη ακίδας του SARS-CoV-2, αποτρέποντας τη σύνδεση της πρωτεΐνης με την πρωτεΐνη ACE2 στην επιφάνεια του ανθρώπινου κυττάρου⁸¹. Το bamlanivimab επιδεικνύει κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από αντίσωμα, αλλά δεν προκαλεί κυτταροτοξικότητα που εξαρτάται από το συμπλήρωμα. Το etesevimab δεν επιδεικνύει ανιχνεύσιμη κυτταροτοξικότητα

εξαρτώμενη από αντισώματα ούτε προκαλεί κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα. Η εκτιμώμενη 50% αποτελεσματική συγκέντρωση (EC50) έναντι του SARS-CoV-2 σε κύτταρα Vero του bamlanivimab, etesevimab και η αναλογία 1:1 bamlanivimab και etesevimab είναι 0,02 mcg/mL, 0,14 mcg/mL και 0,02 mcg/mc αντίστοιχα⁸². Σε μία έρευνα σε ασθενείς με ήπια έως μέτρια COVID-19, το bamlanivimab έδειξε επίδραση στα ιικά φορτία και η ομάδα θεραπείας είχε επίσης λιγότερους ασθενείς με επισκέψεις και νοσηλεία στο τμήμα επειγόντων περιστατικών που σχετίζονται με το COVID-19. Αυτή η επίδραση ήταν ιδιαίτερα έντονη σε μια υποομάδα ασθενών υψηλού κινδύνου, όπως ασθενείς με δείκτη μάζας σώματος >35 ή με ηλικία >65 ετών⁸³. Ωστόσο, η εμφάνιση μεταλλάξεων του ιού είναι ανθεκτικές στην μονοθεραπεία του bamlanivimab. Έτσι, αναπτύχθηκε ένα νέο μονοκλωνικό αντίσωμα που θα χορηγείται με το bamlanivimab, το etesevimab. Το Etesevimab είναι επίσης ένα εξουδετερωτικό μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει την πρωτεΐνη ακίδας του SARS-CoV-2⁸⁰.

Ο συνδυασμός bamlanivimab και etesevimab εγχέεται μαζί για την καταπολέμηση της αντίστασης και των διαφορετικών παραλλαγών του SARS-CoV-2. Και τα δύο μονοκλωνικά αντισώματα απομονώθηκαν από πλάσμα ανάρρωσης σε ασθενείς με COVID-19. Ο FDA χορήγησε άδεια χρήσης έκτακτης ανάγκης τον Φεβρουάριο του 2021 για τη θεραπεία ήπιας έως μέτριας βαρύτητας COVID-19 σε ασθενείς με υψηλό κίνδυνο να αναπτύξουν σοβαρή νόσο. Μία έρευνα έδειξε μείωση του κινδύνου νοσηλείας ή θανάτου κατά 70% σε ασθενείς που έλαβαν τη συνδυασμένη θεραπεία¹⁴⁷. Τον Ιούνιο του 2021, το CDC αναγνώρισε μια αύξηση 11% στη συχνότητα των παραλλαγών Gamma και Beta του COVID-19 στις Ηνωμένες Πολιτείες, οι οποίες δεν αντιμετωπίζονται αποτελεσματικά ούτε από το bamlanivimab ούτε με το etesevimab. Αυτό οδήγησε το Υπουργείο Υγείας και Ανθρωπίνων Υπηρεσιών των ΗΠΑ να σταματήσει τη διανομή αυτών των αντισωμάτων εκείνο τον μήνα. Ωστόσο, επειδή το bamlanivimab και το etesevimab είναι ενεργά έναντι της επί του παρόντος κυρίαρχης παραλλαγής Delta, η διανομή συνεχίστηκε τον Σεπτέμβριο⁸⁴.

Εάν δεν είναι δυνατή η άμεση χορήγηση, το διάλυμα έγχυσης bamlanivimab φυλάσσεται για έως και 48 ώρες σε θερμοκρασία ψυγείου (2°C έως 8°C) και έως 14 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (20°C έως 25°C) συμπεριλαμβανομένης της μεταφοράς και χρόνος έγχυσης. Εάν βρίσκεται στο ψυγείο, το διάλυμα έγχυσης πρέπει να αφήνεται να εξισορροπηθεί σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 λεπτά πριν από τη χορήγηση. Τα έκδοχα του ενέσιμου bamlanivimab είναι L-ιστιδίνη, μονοϋδρική υδροχλωρική L-ιστιδίνη, χλωριούχο νάτριο, σακχαρόζη, πολυσορβικό 80 και ενέσιμο ύδωρ⁸¹. Οι πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες του bamlanivimab και του etesevimab, που χορηγούνται μαζί, είναι ναυτία, ζάλη και φαγούρα. Σε κλινικές δοκιμές παρατηρήθηκαν σοβαρές αντιδράσεις υπερευαισθησίας, συμπεριλαμβανομένης της αναφυλαξίας, και αντιδράσεις σχετιζόμενες με την έγχυση⁸⁵.

4.4 Casirivimab και Imdevimab

Το δεύτερο εγκεκριμένο θεραπευτικό προϊόν αποτελείται από τα 2 μονοκλωνικά αντισώματα, τα casirivimab και imdevimab, τα οποία είναι ανασυνδυασμένα μονοκλωνικά αντισώματα ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης G-1 (IgG1)⁸⁶. Τα αντισώματα συνδέονται με μη επικαλυπτόμενους επιτόπους της περιοχής δέσμησης υποδοχέα πρωτεΐνης ακίδας (RBD) του SARS-CoV-2, γεγονός που εμποδίζει τον ιό να αλληλεπιδράσει με τον ανθρώπινο υποδοχέα ACE2. Σε κύτταρα στόχους Jurkat που εκφράζουν πρωτεΐνες ακίδας SARS-CoV-2, ο συνδυασμός casirivimab και imdevimab προκάλεσε κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από αντισώματα (ADCC) με τελεστικά κύτταρα ανθρώπινου φυσικού φονέα (NK) και κυτταρική φαγοκυττάρωση εξαρτώμενη από αντισώματα (ADCP). Ωστόσο, ο συνδυασμός δεν μεσολάβησε σε εξαρτώμενη από το συμπλήρωμα κυτταροτοξικότητα σε προσδιορισμούς που βασίζονται σε κύτταρα. Η εκτιμώμενη 50% αποτελεσματική συγκέντρωση (EC50) του casirivimab συν imdevimab για την εξουδετέρωση του SARS-CoV-2 σε κύτταρα Vero είναι 0,005 mcg/mL⁸⁷.

Ο FDA εξέδωσε χρήση έκτακτης ανάγκης (EUA) για τη χρήση του casirivimab και του imdevimab στη θεραπεία της λοίμωξης COVID-19 τον Νοέμβριο του

2020. Το EUA αναθεωρήθηκε στις 30 Ιουλίου 2021 για να επεκτείνει τη χρήση του και για την προφύλαξη μετά την έκθεση του COVID-19. Και οι δύο χρήσεις προορίζονται για ήπια έως μέτρια νόσο στα εξωτερικά ιατρεία. Για χρήση ως προφύλαξη μετά την έκθεση, οι ασθενείς με σημαντική έκθεση σε άτομο με λοίμωξη SARS-CoV-2 είναι επιλέξιμοι εάν είτε δεν είναι πλήρως εμβολιασμένοι είτε είναι πλήρως εμβολιασμένοι αλλά αναμένεται να έχουν ανεπαρκή ανοσολογική απόκριση στον εμβολιασμό λόγω ανοσοκατασταλτικής νόσου ή χρήσης φαρμάκων.

Σε μια μελέτη θεραπείας φάσης 3 οι ομάδες θεραπείας casirivimab-imdevimab κατέδειξαν μείωση της νοσηλείας που σχετίζεται με το COVID-19 ή του θανάτου από κάθε αιτία, καθώς και πιο γρήγορη επίλυση των συμπτωμάτων του COVID-19 σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο [88]. Διανέμονται μαζί ως κοκτέιλ με την επωνυμία REGEN-COV, σε δόση 600 mg συνχορηγούμενο με imdevimab 600 mg ως IV έγχυση ή ως υποδόριες ενέσεις. Ως ανεπιθύμητες αντιδράσεις μπορούν να εμφανιστούν πυρετός, έξαψη, αντίδραση στο σημείο της ένεσης, ναυτία, κνησμός, εξάνθημα, κνίδωση, εμετός, δύσπνοια, ερύθημα και αντιδράσεις που σχετίζονται με την έγχυση. Πιο σπάνια μπορεί να εμφανιστούν αναφυλακτοειδείς αντιδράσεις⁸⁷.

4.5 Sotrovimab

Το Sotrovimab είναι το τρίτο ανασυνδυασμένο μονοκλωνικό αντίσωμα ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης G-1 (IgG1-κ) που χρησιμοποιείται ως αντικό φάρμακο για τη στόχευση του σοβαρού οξέος αναπνευστικού συνδρόμου του κορωνοϊού 2 (SARS-CoV-2). Αυτό το αντίσωμα συνδέεται με έναν επίτοπο στον τομέα δέσμησης του υποδοχέα πρωτεΐνης ακίδας (RBD) του SARS-CoV-2, όπου αναστέλλει ένα προσδιόριστο βήμα που συμβαίνει μετά την ιική προσκόλληση αλλά πριν από τη σύντηξη των μεμβρανών του ιού και του κυττάρου ξενιστή. Σε κυτταροκαλλιέργειες, το sotrovimab προκάλεσε κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από αντισώματα (ADCC) χρησιμοποιώντας ανθρώπινα κύτταρα φυσικού φονέα (NK) και εξαρτώμενη από αντισώματα κυτταρική φαγοκυττάρωση (ADCP) χρησιμοποιώντας μονοκύτταρα CD14.

Η μέση αποτελεσματική συγκέντρωση 50% (EC50) του sotrovimab στην εξουδετέρωση του SARS-CoV-2 σε κύτταρα Vero είναι 100,1 ng/mL και η μέση EC90 είναι 186,3 ng/mL⁸⁸.

Η χρήση του περιορίζεται σε εξωτερικά ιατρεία σε ενήλικες και παιδιατρικούς ασθενείς 12 ετών και μεγαλύτερης ηλικίας με βάρος τουλάχιστον 40 kg που διατρέχουν υψηλό κίνδυνο εξέλιξης σε σοβαρή μορφή COVID-19, συμπεριλαμβανομένης της νοσηλείας ή του θανάτου και των μη πλήρως εμβολιασμένων ή των πλήρως εμβολιασμένων που δεν αναμένεται να εμφανίσουν επαρκή ανοσολογική απόκριση και έχουν εκτεθεί ή που διατρέχουν υψηλό κίνδυνο να εκτεθούν σε άτομο που έχει μολυνθεί με SARS-CoV-2⁸⁰.

Είναι ένα προϊόν της GlaxoSmithKline, που δημιουργήθηκε από ένα αντίσωμα που εντοπίστηκε το 2003 σε έναν επιζώντα από σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο (SARS). Φυλάσσεται τα φιαλίδια στο ψυγείο στους 2°C έως 8°C στο αρχικό κουτί για να προστατεύονται από το φως. Δεν καταψύχεται. Το διάλυμα του sotrovimab στο φιαλίδιο απαιτεί αραίωση πριν από τη χορήγηση. Το αραιωμένο διάλυμα του sotrovimab προορίζεται για άμεση χρήση. Εάν δεν είναι δυνατή η άμεση χορήγηση, το αραιωμένο διάλυμα μπορεί να φυλαχθεί για έως και 6 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (έως 25°C) ή στο ψυγείο έως και 24 ώρες (2°C έως 8°C). Εάν διατηρηθεί στο ψυγείο, το διάλυμα έγχυσης αφήνεται να εξισορροπηθεί σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 15 λεπτά πριν τη χορήγηση. Είναι ένα στείρο, χωρίς συντηρητικά, διαυγές, άχρωμο ή κίτρινο έως καφέ διάλυμα και διατίθεται σε γυάλινο φιαλίδιο μίας χρήσης (500 mg / 8 mL). Το διάλυμα έχει pH 6,0. Κάθε mL περιέχει 62,5mg sotrovimab σε διάλυμα με L-ιστιδίνη, L-ιστιδίνη μονοϋδροχλωρική, σακχαρόζη, L-μεθειονίνη, πολυσορβικό 80 και ενέσιμο ύδωρ⁸⁹. Χορηγείται ως εφάπαξ ενδοφλέβια έγχυση δόσης 500mg σε διάστημα 30 λεπτών^{80, 86}. Ανεπιθύμητες ενέργειες που μπορεί να προκαλέσει είναι κρύαδες, διάρροια, ζάλη, πυρετό, κνησμό, εξάνθημα, δύσπνοια, αντιδράσεις που σχετίζονται με την έγχυση και πιο σπάνια αναφυλακτοειδείς αντιδράσεις και βρογχόσπασμο⁹⁰.

5. Φαρμακοκινητική Μονοκλωνικών Αντισωμάτων

Ο αριθμός των μονοκλωνικών αντισωμάτων που είναι διαθέσιμα για κλινική χρήση και υπό ανάπτυξη έχει αυξηθεί δραματικά τα τελευταία 10 χρόνια. Η κατανόηση της φαρμακοκινητικής και της φαρμακοδυναμικής τους είναι απαραίτητη για επιλογή του σωστού κλινικού υποψηφίου, της σωστής δόσης και του σχήματος για ένδειξη στόχου⁹¹.

5.1 Απορρόφηση και οδοί χορήγησης mAbs

Ο γαστρεντερικός σωλήνας παρέχει ένα εχθρικό περιβάλλον για αντισώματα και άλλες θεραπευτικές πρωτεΐνες. Τα αντισώματα μπορεί να υποστούν μετασύνθεση στο όξινο pH του στομάχου και πρωτεολυτική αποικοδόμηση εντός του στομάχου και του εντέρου. Επιπλέον, λόγω του μεγάλου μοριακού τους μεγέθους και της υψηλής πολικότητας, τα αντισώματα αναμένεται να εμφανίζουν ελάχιστους ρυθμούς διάχυσης μέσω του γαστρεντερικού επιθηλίου¹⁶⁰. Έτσι, τα mAbs έχουν περιορισμένη γαστρεντερική σταθερότητα και κακή λιποφιλικότητα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανεπαρκή αντίσταση ενάντια στο εχθρικό πρωτεολυτικό γαστρεντερικό περιβάλλον και πολύ περιορισμένη διείσδυση μέσω του λιπόφιλου εντερικού τοιχώματος. Τα mAbs, επομένως, χορηγούνται συνήθως παρεντερικά⁹¹.

Η πλειονότητα των εγκεκριμένων από τον FDA θεραπευτικών αντισωμάτων χορηγούνται ενδοφλεβίως. Η ενδοφλέβια οδός έχει προτιμηθεί επειδή επιτρέπει την πλήρη συστηματική διαθεσιμότητα, την ταχεία παροχή αντισωμάτων στη συστηματική κυκλοφορία και την επίτευξη υψηλών συγκεντρώσεων. Επιπλέον, σε σχέση με άλλες παρεντερικές οδούς χορήγησης, η ενδοφλέβια οδός επιτρέπει τη χορήγηση μεγαλύτερων όγκων. Ωστόσο, η ενδοφλέβια παράδοση έχει τους περιορισμούς της. Αυτή η οδός δεν είναι βολική για τους ασθενείς, που συχνά απαιτούν νοσηλεία, αυξάνοντας έτσι σημαντικά το κόστος της θεραπείας. Η ταχεία έγχυση αντισώματος μπορεί επίσης να επισπεύσει ανεπιθύμητα συμβάντα και, κατά συνέπεια, υπήρξε κάποιο ενδιαφέρον για εξωαγγειακές οδούς χορήγησης αντισωμάτων (π.χ. υποδόρια, ενδομυϊκή, κ.λπ.)⁹².

Ο κύριος μηχανισμός της διάχυσης των αντισωμάτων στους ιστούς επιτυγχάνεται με τη μεταφορά μέσω των παρακυτταρικών πόρων στις μεμβράνες των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων. Είναι επίσης δυνατή η υποδόρια ή ενδομυϊκή χορήγηση, μετά την οποία η απορρόφηση διευκολύνεται από το λεμφικό σύστημα. Ωστόσο, η βιοδιαθεσιμότητα μετά από υποδόρια και ενδομυϊκή χορήγηση είναι συχνά χαμηλή έως ενδιάμεση, σε σύγκριση με φάρμακα μικρού μορίου, που μπορεί να εξηγηθεί από την πρωτεολυτική αποδόμηση του mAb στο διάμεσο υγρό ή στο λεμφικό σύστημα ⁹².

Η μορφολογία του δέρματος, η καταβολική ικανότητα στο σημείο της ένεσης, η ροή αίματος στο σημείο της ένεσης και η συγγένεια FcRn είναι χαρακτηριστικά που παίζουν ρόλο στο προφίλ απορρόφησης σε κάθε είδος ⁹³. Τα ειδικά για το άτομο χαρακτηριστικά που μπορούν να επηρεάσουν την απορρόφηση είναι το σωματικό βάρος, το φύλο, η ηλικία, το επίπεδο δραστηριότητας, η κατάσταση της νόσου, ο αναπνευστικός ρυθμός και η αρτηριακή πίεση ⁹⁴. Στους ανθρώπους, το πάχος του υποδόριου αυξάνεται με το σωματικό βάρος, μειώνεται με την ηλικία και εξαρτάται από το φύλο, το οποίο έχει τη δυνατότητα να οδηγήσει σε διαφορετική συμπεριφορά και μεταβλητότητα απορρόφησης ⁹⁵. Ως συνέπεια όλων αυτών των παραγόντων, υπάρχει σημαντική διακύμανση στον ρυθμό και την έκταση της απορρόφησης μεταξύ διαφορετικών mAb και μεταξύ διαφορετικών ατόμων για το ίδιο mAb ⁹⁶.

Επειδή η ροή του λεμφικού υγρού στα λεμφικά αγγεία είναι πολύ αργή σε σύγκριση με τη ροή του αίματος στα τριχοειδή αγγεία, η προκύπτουσα διαδικασία απορρόφησης των mAbs στη συστηματική κυκλοφορία μετά την υποδορική χορήγηση είναι επίσης αργή, με αντίστοιχη αργή αύξηση της συγκέντρωσης στο πλάσμα και καθυστερημένο χρόνο για τη μέγιστη συγκέντρωση (Tmax) ⁹⁷. Ο ρυθμός απορρόφησης είναι αργός με τις μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα που παρατηρούνται 1-8 ημέρες μετά την υποδόρια ή την ενδοφλέβια ένεση ⁹⁸.

Γενικά αναφέρεται απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα μεταξύ 50 και 100%. Πρακτικά, η βιοδιαθεσιμότητα καθορίζεται από τους σχετικούς ρυθμούς προσυστημικού καταβολισμού και συστημικής απορρόφησης.

Ο προσυστημικός καταβολισμός μπορεί να εξαρτάται από τους ρυθμούς εξωκυτταρικής αποικοδόμησης (π.χ. μέσω πρωτεόλυσης), τους ρυθμούς αντισωμάτων ενδοκυττάρωσης (π.χ. μεσολαβούμενη από υποδοχέα, υγρή φάση) και ρυθμούς ανακύκλωσης μέσω αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα Brambell (FcRn). Το FcRn προστατεύει το IgG από τον ενδοκυτταρικό καταβολισμό και το FcRn έχει αποδειχθεί ότι είναι ικανό να μεταφέρει IgG κατά μήκος κυτταρικές μονοστοιβάδες και στις δύο κατευθύνσεις από την κορυφή προς τη βάση και από τη βάση προς την κορυφή. Οι πνεύμονες έχουν πολύ μεγάλη επιφάνεια και υψηλό ποσοστό αιμάτωσης. Επιπλέον, τα πνευμονικά επιθηλιακά κύτταρα είναι γνωστό ότι εκφράζουν τον FcRn, ο οποίος μπορεί να διευκολύνει την αποτελεσματική συστηματική απορρόφηση του χορηγούμενου αντισώματος στον πνεύμονα. Οι πνεύμονες έχουν πολύ μεγάλη επιφάνεια και υψηλό ποσοστό αιμάτωσης. Η σκοπιμότητα της πνευμονικής παροχής αντισωμάτων περιορίζεται πιθανώς σε αυτά τα αντισώματα που σχετίζονται με πολύ υψηλή δοσολογία, γιατί μόνο μικροί όγκοι υγρού μπορεί να χορηγηθούν στον πνεύμονα ⁹⁹.

5.2 Κατανομή Μονοκλωνικών Αντισωμάτων

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν την κατανομή των mAb σε ιστούς ή όργανα, όπως η συγγένεια πρόσδεσής τους σε συγκεκριμένα αντιγόνα στόχους, ο ρυθμός εσωτερίκευσης στόχου, η υδροφιλία του mAb, το φορτίο και τα ειδικά για τον ιστό χαρακτηριστικά όπως η δομή της μεμβράνης και η ροή του αίματος. Με τη βελτιστοποίηση αυτών των παραμέτρων, θα μπορούσε να επιτευχθεί ένα δυναμικά βελτιωμένο προφίλ κατανομής. Η εξαγγείωση του mAb μπορεί να συμβεί μέσω τριών βασικών διεργασιών: παθητική διάχυση, μεταφορική μεταφορά και διακυττάρωση μέσω των αγγειακών επιθηλιακών κυττάρων ⁹⁶.

Γενικά, ο όγκος κατανομής των mAbs είναι σχετικά μικρός λόγω του υψηλού μοριακού τους βάρους και της φτωχής λιποφιλικότητας τους. Οι τυπικές τιμές για τον όγκο κατανομής των mAbs στο κεντρικό διαιρέσιμα (Vc) και τον όγκο σταθερής κατάστασης (Vss) στον άνθρωπο είναι στην περιοχή των 2-3L και

3,5-7L, αντίστοιχα. Αυτές οι τιμές υποδεικνύουν ότι η κατανομή των mAbs περιορίζεται στην κυκλοφορία του αίματος και στους εξωκυτταρικούς χώρους⁹¹.

Οι συγκεντρώσεις αντισωμάτων στο διάμεσο υγρό των ιστών είναι σημαντικά χαμηλότερες από τις συγκεντρώσεις αντισωμάτων στο πλάσμα λόγω των διαφορών στον ρυθμό μεταφοράς μέσω μεταφοράς (η οποία είναι αργή) και στην απομάκρυνση του αντισώματος από τον ιστό (η οποία θα μπορούσε να είναι γρήγορη). Ωστόσο, υψηλότερες συγκεντρώσεις αντισωμάτων έχουν παρατηρηθεί σε ιστούς που έχουν υψηλή διάχυση και με σχετικά διαρροή αγγείωση (π.χ. μυελός των οστών, σπλήνα και ήπαρ)¹⁰⁰.

Λόγω των φυσικοχημικών ιδιοτήτων και του μεγάλου μεγέθους των mAbs, η παθητική διάχυση δεν παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία εξαγγείωσης. Ο κύριος μηχανισμός με τον οποίο τα mAbs διανέμονται από το αίμα στον ιστό είναι μέσω της μεταφοράς. Το φαινόμενο κοσκινίσματος καθορίζεται από το μέγεθος, τη στρεβλότητα και τον αριθμό των πόρων, καθώς και από το μέγεθος, το σχήμα και το φορτίο του mAb⁹⁶. Η αρχή πίσω από τη μεταφορά είναι ότι η διαφορά μεταξύ υδροστατικών και ογκοτικών (κολλοειδών οσμωτικών) πιέσεων, σε συνδυασμό με το φαινόμενο κοσκίνισης, συμβάλλει στην καθαρή κινητήρια δύναμη για την εξαγγείωση του mAb.

Ο υποδοχέας Fc, μπορεί να είναι μια άλλη σημαντική οδός εξαγγείωσης για τα mAbs, ειδικά σε ιστούς στους οποίους η εξαγγείωση μέσω μεταφοράς είναι περιορισμένη¹⁰¹. Η διαμεσολαβούμενη από FcRn διακυττάρωση μπορεί επίσης να παίζει ρόλο στην κατανομή των mAbs από τον αγγειακό χώρο προς τα διαμερίσματα ιστού⁹⁶.

Οι Shah και Betts διεξήγαγαν αναλύσεις δεδομένων βιοκατανομής μη δεσμευτικών mAbs από πολλά διαφορετικά είδη (ποντίκια, αρουραίος, πίθηκος και άνθρωπος). Χρησιμοποιώντας ένα φυσιολογικά βασισμένο φαρμακοκινητικό μοντέλο (PBPK), μπόρεσαν να ορίσουν τη σχέση μεταξύ του πλάσματος και των διαφόρων συγκεντρώσεων στους ιστούς ως τον συντελεστή βιοκατανομής αντισωμάτων. Βρήκαν ότι συνήθως η συγκέντρωση του mAb στον πνεύμονα είναι 15%, καρδιά 10%, νεφρός 14%, μυς 4%, δέρμα 16%, λεπτό έντερο 5%, παχύ έντερο 5%, σπλήνα 13%, ήπαρ 12%, οστά 7 %, στομάχι 5%, λεμφαδένες

8%, λιπώδης 5%, εγκέφαλος 0,4%, πάγκρεας 6%, όρχεις 6%, θυροειδής 68% και θύμος 7% της συγκέντρωσης στο πλάσμα¹⁰². Αυτά τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με τις γενικές εκτιμήσεις του εύρους αναλογίας ιστού προς αίμα από 0,1 έως 0,5 για mAbs⁹².

Η μέση συγκέντρωση αντισωμάτων στον όγκο δεν αυξάνεται γραμμικά με τη συγγένεια. Η υψηλή συγγένεια αντισωμάτων σε μια δεδομένη δόση τείνει να μειώνει τη διήθηση ή τη διείσδυση αντισωμάτων στον όγκο επειδή η σύνδεση υψηλής συγγένειας στην άκρη του όγκου οδηγεί σε λιγότερα ελεύθερα μόρια αντισώματος. Αυτό το φαινόμενο ονομάστηκε «φραγμός δεσμευτικής θέσης»¹⁰³.

5.3 Καταβολισμός Μονοκλωνικών Αντισωμάτων

Τα αντισώματα αποβάλλονται είτε με απέκκριση είτε με καταβολισμό. Σε αντίθεση με τα μικρά μόρια, τα mAbs είναι πολύ μεγάλα για να φιλτράρονται από τα νεφρά και δεν αποβάλλονται στα ούρα, εκτός από παθολογικές καταστάσεις. Εάν φιλτράρονται θραύσματα αντισωμάτων χαμηλού μοριακού βάρους, συνήθως επαναρροφούνται και μεταβολίζονται στο εγγύς σωληνάριο του νεφρώνα¹⁰⁴.

Τα θεραπευτικά mAbs συχνά παρουσιάζουν δύο διακριτές καταβολικές οδούς:

i) μια μη ειδική οδό κάθαρσης που προκαλείται από την αλληλεπίδραση μεταξύ της περιοχής Fc των υποδοχέων mAb και Fc και

ii) μια ειδική οδό κάθαρσης που προκαλείται από την ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ της περιοχής Fab του mAb και του αντιγονικού του στόχους.

Η ειδική οδός κάθαρσης μπορεί να είναι κορεσμένη, ανάλογα με τη δόση του mAb και το επίπεδο έκφρασης του στόχου. Ωστόσο, η μη ειδική οδός έχει μεγάλη χωρητικότητα και οι τιμές κάθαρσης που σχετίζονται με αυτήν την οδό είναι γενικά γραμμικές στο εύρος της θεραπευτικής δόσης 1-20 mg/kg για τα περισσότερα mAbs που διατίθενται στο εμπόριο⁹¹.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο αντίκτυπος της διαμόρφωσης δέσμευσης FcRn στην κάθαρση των mAbs εξαρτάται επίσης από τη σχετική συμβολή της οδού διάσωσης με τη μεσολάβηση FcRn στη συνολική

κάθαρση έναντι άλλων μηχανισμών εξάλειψης. Για παράδειγμα, εάν η δέσμευση στο στόχο και ο επακόλουθος καταβολισμός είναι η κυρίαρχη οδός κάθαρσης για ένα συγκεκριμένο mAb, τα βελτιωμένα χαρακτηριστικά δέσμευσης FcRn μπορεί να έχουν οριακή μόνο επίδραση στην παράταση του χρόνου ημιζωής αυτού του mAb. Εκτός από τη μη ειδική οδό κάθαρσης, τα mAbs μπορούν επίσης να εξαλειφθούν μέσω αλληλεπίδρασης με τους στόχους τους (ειδική οδό εκκαθάρισης), η οποία μπορεί να είναι συνδεδεμένη ή διαλυτή σε κύτταρα. Ανάλογα με το επίπεδο έκφρασης και τον ρυθμό ανακύκλωσης των στόχων, η ειδική κάθαρση των mAbs θα μπορούσε να είναι μη γραμμική σε χαμηλές δόσεις όταν οι στόχοι δεν είναι κορεσμένοι και να πλησιάζει το γραμμικό εύρος σε υψηλότερες δόσεις όταν οι στόχοι είναι κορεσμένοι. Επομένως, σε χαμηλές δόσεις, τα mAbs παρουσιάζουν μικρότερο χρόνο ημιζωής και ταχύτερη κάθαρση. Καθώς η δόση αυξάνεται, ο χρόνος ημιζωής σταδιακά αυξάνεται και η κάθαρση σταδιακά μειώνεται σε σταθερή τιμή¹⁰⁵. Έτσι, για να αποφευχθούν μεγάλες διακυμάνσεις και υψηλές αναλογίες συγκέντρωσης κορυφής προς κατώτατο σημείο στη μη γραμμική περιοχή, τα περισσότερα κλινικά προσβάσιμα mAbs έχουν γραμμική PK σε θεραπευτικές δόσεις. Η δοσοεξαρτώμενη κάθαρση και ο χρόνος ημιζωής παρατηρούνται συχνότερα σε mAbs που αλληλεπιδρούν με αντιγόνα που εκφράζονται στην κυτταρική μεμβράνη. Η συγγένεια δέσμευσης, η πυκνότητα του αντιγόνου και ο ρυθμός εναλλαγής αντιγόνου μπορεί να επηρεάσουν την αποβολή που προκαλείται από τον υποδοχέα⁹¹.

5.4 Φαρμακοκινητική bamlanivimab και etesevimab

Το bamlanivimab χορηγείται σε δόση 700 mg συν-χορηγούμενο με 1.400mg etesevimab με ενδοφλέβια έγχυση σε χλωριούχο νάτριο 0,9% εντός 10 ημερών από την έναρξη των συμπτωμάτων⁸⁶. Δεν υπάρχουν αλλαγές στη φαρμακοκινητική κανενός φαρμάκου όταν χορηγείται μόνο του ή μαζί⁸².

Το φαρμακοκινητικό προφίλ του bamlanivimab είναι γραμμικό και ανάλογο με τη δόση μεταξύ 700

mg και 7000 mg μετά από μία μόνο ενδοφλέβια χορήγηση¹⁰⁶. Μόλις εισέλθει στη συστηματική κυκλοφορία, ο μέσος όγκος κατανομής του κεντρικού και περιφερειακού διαμερίσματος είναι 2,87 L και 2,71 L, αντίστοιχα. Η μέση μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα (C_{max}) από μια δόση bamlanivimab 700 mg είναι 196 mcg/mL (90% CI: 102 έως 378 mcg/mL). Η κάθαρση και η μέση φαινομενική τελική ημιζωή αποβολής για το bamlanivimab είναι 0,27 L/ώρα και 17,6 ημέρες, αντίστοιχα. Το φάρμακο αναμένεται να αποικοδομηθεί σε μικρά πεπτίδια και συστατικά αμινοξέων μέσω καταβολικών οδών παρόμοια με τα ενδογενή αντισώματα IgG.

Το φαρμακοκινητικό προφίλ του etesevimab είναι γραμμικό και ανάλογο με τη δόση μεταξύ 700 mg και 7000 mg μετά από μία μόνο ενδοφλέβια χορήγηση. Μόλις εισέλθει στη συστηματική κυκλοφορία, ο μέσος όγκος κατανομής του κεντρικού και περιφερειακού διαμερίσματος είναι 2,38 L και 1,98 L αντίστοιχα. Η μέση μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα (C_{max}) από μια δόση etesevimab 1.400 mg είναι 504 mcg/mL (90% CI: 262 έως 974 mcg/mL). Η κάθαρση και ο μέσος χρόνος ημιζωής για το etesevimab είναι 0,128 L/ώρα και 25,1 ημέρες, αντίστοιχα. Το φάρμακο αναμένεται να αποικοδομηθεί σε μικρά πεπτίδια και συστατικά αμινοξέων μέσω καταβολικών οδών παρόμοια με τα ενδογενή αντισώματα IgG.

Τόσο το bamlanivimab όσο και το etesevimab είναι ποσοτικοποιήσιμα για τουλάχιστον 29 ημέρες μετά τη δόση. Την ημέρα 29, η μέση συγκέντρωση bamlanivimab είναι 22 mcg/mL (90% CI: 10,7 έως 41,6 mcg/mL) και η μέση συγκέντρωση etesevimab είναι 111 mcg/mL (90% CI: 57,4 έως 199 mcg/mL)⁸².

Με βάση τη φαρμακοκινητική ανάλυση του πληθυσμού, δεν υπάρχει διαφορά στη φαρμακοκινητική του bamlanivimab ή του etesevimab σε ασθενείς με ήπια ηπατική δυσλειτουργία σε σύγκριση με ασθενείς με φυσιολογική ηπατική λειτουργία. Το bamlanivimab και το etesevimab δεν αποβάλλονται ανέπαφα στα ούρα. Η φαρμακοκινητική του bamlanivimab και του etesevimab δεν αναμένεται να επηρεαστεί από τη νεφρική λειτουργία ή την παρουσία αιμοκάθαρσης¹⁰⁷.

5.5 Φαρμακοκινητική casirivimab και imdevimab

Τα φαρμακοκινητικά τους προφίλ αναμένεται να είναι σύμφωνα με το προφίλ άλλων μονοκλωνικών αντισωμάτων IgG1. Το casirivimab και το imdevimab δεν μεταβολίζονται από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, ούτε απεκκρίνονται από τα νεφρά. Τα μονοκλωνικά αντισώματα με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 69 kDa είναι γνωστό ότι δεν υφίστανται νεφρική αποβολή. Επομένως, η νεφρική δυσλειτουργία και η αιμοκάθαρση δεν αναμένεται να επηρεάσουν τη φαρμακοκινητική του casirivimab (145,23 kDa) ή του imdevimab (144,14 kDa).

Μετά από ενδοφλέβια χορήγηση, το casirivimab και το imdevimab εμφανίζουν γραμμική και ανάλογη με τη δόση φαρμακοκινητική μεταξύ δόσεων 600 mg/600 mg και 4.000 mg/4.000 mg. Αμέσως μετά από μία εφάπαξ ενδοφλέβια δόση 600 mg/600 mg, οι μέσες συγκεντρώσεις στο πλάσμα για το casirivimab και το imdevimab ήταν 192 mg/L και 198 mg/L, αντίστοιχα. Οι μέσες συγκεντρώσεις για το casirivimab και το imdevimab την ημέρα 29 (δηλαδή, 28 ημέρες μετά τη δόση) ήταν 46.2 mg/L και 38.5 mg/L, αντίστοιχα. Για τα σχήματα προφύλαξης επαναλαμβανόμενων δόσεων, οι προσομοιώσεις φαρμακοκινητικής πληθυσμού προβλέπουν ότι οι κατώτερες συγκεντρώσεις στον ορό σε σταθερή κατάσταση μετά την αρχική δόση 600 mg casirivimab και 600 mg imdevimab ακολουθούμενη από κάθε 4 εβδομάδες δόσεις των 300 mg casirivimab και 300 mg casirivimab είναι παρόμοιες ή ελαφρώς υψηλότερες από τις μέσες συγκεντρώσεις της ημέρας 29 που παρατηρήθηκαν για μια εφάπαξ υποδόρια δόση 600 mg casirivimab και 600 mg imdevimab.

Μετά από εφάπαξ υποδόρια δόση 600 mg casirivimab και 600 mg imdevimab, οι μέσες μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα (C_{max}) των 55.6 mg/L και 52.7 mg/L, αντίστοιχα, επιτεύχθηκαν σε 8 ημέρες (εύρος: 4 έως 87 ημέρες) για το casirivimab και 7

ημέρες (εύρος: 4 έως 15 ημέρες) για το imdevimab. Οι συστηματικές εκθέσεις ήταν 1.060 mg x ημέρα/L για το casirivimab και 950 mg x ημέρα/L για το imdevimab. Οι παρατηρούμενες μέσες συγκεντρώσεις στο πλάσμα την ημέρα 29 (δηλαδή, 28 ημέρες μετά τη χορήγηση) ήταν 30.7 mg/L για το casirivimab και 24.8 mg/L για το imdevimab. Ο χρόνος ημιζωής του casirivimab και του imdevimab μετά από υποδόριες ενέσεις ήταν 31.8 ημέρες και 26.9 ημέρες, αντίστοιχα. Για τα σχήματα προφύλαξης επαναλαμβανόμενης δόσης, οι φαρμακοκινητικές προσομοιώσεις πληθυσμού προβλέπουν ότι οι ελάχιστες συγκεντρώσεις στον ορό σε σταθερή κατάσταση μετά την αρχική δόση casirivimab των 600 mg και 600 mg imdevimab ακολουθούμενη από δόσεις κάθε 4 εβδομάδες των 300 mg casirivimab και 300 mg casirivimab είναι παρόμοιες ή ελαφρώς υψηλότερες από τις μέσες συγκεντρώσεις της ημέρας 29 που παρατηρήθηκαν για μια εφάπαξ υποδόρια δόση 600 mg casirivimab και 600 mg imdevimab⁸⁷.

5.6 Φαρμακοκινητική Sotrovimab

Το Sotrovimab χορηγείται μέσω ενδοφλέβιας έγχυσης. Το μονοκλωνικό αντίσωμα έχει μέσο όγκο κατανομής σε σταθερή κατάσταση 8.1 L και αποικοδομείται από πρωτεολυτικά ένζυμα που κατανέμονται σε όλο το σώμα. Η μέση συστηματική κάθαρση είναι 125 mL/ημέρα και ο διάμεσος τελικός χρόνος ημιζωής είναι περίπου 49 ημέρες.

Σε ενδοφλέβια χορήγηση βρέθηκε ότι η μέση μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα (C_{max}) μετά από 1 ώρα ενδοφλέβια έγχυση sotrovimab είναι 117,6 mcg/mL (n = 290, CV% 46,5) και η γεωμετρική μέση συγκέντρωση της ημέρας 29 είναι 24,5 mcg/mL (n = 372, CV% 42,4). Τα μονοκλωνικά αντισώματα με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 69 kDa δεν υφίστανται νεφρική αποβολή. Επομένως, ούτε η νεφρική δυσλειτουργία ούτε η παρουσία αιμοκάθαρσης αναμένεται να επηρεάσουν τη φαρμακοκινητική του sotrovimab (149 kDa)⁹⁰. □

SARS-CoV-2 coronavirus: Pathogenesis, Pharmacotherapy and Treatment with Monoclonal Antibodies

Sofia Ntousi, Vangelis Karalis

Section of Pharmaceutical Technology, Department of Pharmacy, National and Kapodistrian University of Athens

KEYWORDS:

**SARS-Cov2;
Pharmacotherapy;
Monoclonal antibodies;
Pharmacokinetics**

Article Info:

Received: March, 29, 2022

Revised: April 28, 2022

Accepted: May 5, 2022

published on line: July, 19, 2022

* CORRESPONDING

AUTHOR:

Vangelis Karalis
Department of Pharmacy, National and Kapodistrian University of Athens, 15784, Athens, Greece
Email: vkaralis@pharm.uoa.gr

ABSTRACT

The COVID-19 disease first appeared in 2019 and has spread widely. The SARS-CoV-2 virus that causes it is a member of the coronavirus family and is rapidly transmitted, primarily by droplets. In the disease, there is increased secretion of pro-inflammatory cytokines. There are several diagnostic methods, with RNA-qPCR-based detection being the most important and reliable. Vaccination is required to prevent the disease. COVID -19 Vaccines use viral vectors, the mRNA of the virus, certain subunits of the virus such as spike protein (S), and the inactivated virus itself. Some drugs that have been used for other diseases can be used for treatment, but one promising avenue is the use of monoclonal antibodies. Neutralizing monoclonal antibodies primarily target the SARS-CoV-2 spike protein (S).

Most monoclonal antibodies have been identified to recognize the S1 fragment of SARS-CoV2. The receptor binding domain (RBD) in the S1 subunit is the most important target for SARS-CoV-2 because monoclonal antibodies can block the interaction of RBD and ACE2 of the receptor. If anti-SARS-CoV-2 mAbs are used, treatment should be initiated as soon as possible after receiving a positive diagnostic result and within 10 days of symptom onset. Currently, three monoclonal antibody products are approved for COVID-19, namely bamlanivimab/etesevimab, casirivimab/imdevimab, and sotrovimab. Understanding their pharmacokinetics and pharmacodynamics is essential for selecting the right antibody, dose and treatment regimen for the target indication. In this context, this study provides a comprehensive overview of the pharmacology, pharmacokinetics and dosing regimens of monoclonal antibodies against SARS-CoV-2 virus.

References

1. Ellul M.A., Benjamin L., Singh B., Lant S., Michael B.D., Easton A., Kneen R., Defres S., Sejvar J., Solomon T. Neurological associations of COVID-19. *Lancet Neurol.* 19(9), 767- 783, 2020.
2. Khan M., Adil S.F., Alkhathlan H.Z., Tahir M.N., Saif S., Khan M., Khan S.T. COVID-19: A Global Challenge with Old History, Epidemiology and Progress So Far. *Molecules.* 26(1),39, 2020.
3. Liu X., Liu C., Liu G., Luo W., Xia N. COVID-19: Progress in diagnostics, therapy and vaccination. *Theranostics.* 10(17),7821-7835, 2020.
4. Adil MT., Rahman R., Whitelaw D., Jain V., Al-Taani O., Rashid F., Munasinghe A., Jambulingam P. SARS-CoV-2 and the pandemic of COVID-19. *Postgraduate Medical Journal.* 97(1144),110-116, 2021.
5. European Centre for Disease Prevention and Control, An agency of the European Union, Latest Evidence/Coronaviruses 15 September 2021. <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/latest-evidence/coronaviruses>
6. Nanshan C., Min Z., Xuan D., Jieming Q., Fengyun G., Yang H., Yang Q., Jingli W., Ying L., Wei Y., Jia'an X., Ting Y., Xinxin Z., Li Z. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet.* 395,507-513, 2020.
7. Ke Z., Oton J., Qu K., Cortese M., Zila V., McKeane L., Nakane T., Zivanov J., Neufeldt CJ., Cerikan B., Lu JM., Peukes J., Xiong X., Kräusslich HG., Scheres SHW., Bartenschlager R., Briggs JAG. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature.* 588(7838),498-502, 2020.
8. Du L., He Y., Zhou Y., Liu S., Zheng BJ., Jiang S. The spike protein of SARS-CoV-a target for vaccine and therapeutic development. *Nat. Rev. Microbiol.* 7(3),226-36, 2009.
9. Du L., Yang Y., Zhou Y., Lu L., Li F., Jiang S. MERS-CoV spike protein: a key target for antivirals. *Molecules.* 21(2),131-143, 2017.
10. Liji T. Neutralizing SARS-CoV-2 via S protein. *News Medical Life Sciences*, 2020.
11. Chen Y., Liu Q., Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J. Med. Virol.* 92(4),418-423, 2020.
12. Fung T.S., Liu D.X. Coronavirus infection, ER stress, apoptosis and innate immunity. *Fronti. Microbiol.* 17 (5), 296, 2014.
13. Scientific Brief: SARS-CoV-2 Transmission. *Centre of Disease Control and Prevention.* Updated 2021.
14. Yang S., Lee GW., Chen CM., Wu CC., Yu KP. The size and concentration of droplets generated by coughing in human subjects. *J Aerosol Med.* 20(4),484-94, 2007.
15. Salian V.S., Wright J.A., Vedell P.T., Nair S., Li C., Kandimalla M., Tang X., Carmona P., Kalari K.R., Kandimalla K.K. COVID-19 Transmission, Current Treatment, and Future Therapeutic Strategies. *Mol. Pharmaceutics* 18(3),754-771, 2021.
16. Asadi S., Bouvier N., Wexler AS., Ristenpart W.D. The coronavirus pandemic and aerosols: Does COVID-19 transmit via expiratory particles? *Aerosol Sci. Technol.* 0(0),1- 4, 2020.
17. Gao Z., Xu Y., Sun C., Wang X., Guo Y., Qiu S., Ma K. A systematic review of asymptomatic infections with COVID-19. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 54(1), 12-16, 2021.
18. Zou L., Ruan F., Huang M., Liang L., Huang H., Hong Z., Yu J., Kang M., Song Y., Xia J., Guo Q., Song T., He J., Yen H.L., Peiris M., Wu J. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N. Engl. J. Med.* 382(12),1177-1179, 2020.
19. Wölfel R., Corman VM., Guggemos W., Seilmaier M., Zange S., Müller MA., Niemeyer D., Jones T.C., Vollmar P., Rothe C., Hoelscher M., Bleicker T., Brünink S., Schneider J., Ehmann R., Zwirgmaier K., Drosten C., Wendtner C. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature.* 581(7809), 465-469, 2020.
20. Asselah T., Durantel D., Pasmant E., Lau G., Schinazi R.F. COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development. *J.Hepatol.* 74(1), 168-184, 2021.

21. Guan W.J., Ni Z.Y., Hu Y., Liang W.H., Ou C.Q., He J.X., Liu L., Shan H., Lei C.L., Hui D., Du B., Li L., Zeng G., Yuen K., Chen R., Tang C., Wang T., Chen P., Xiang J., Li S., Wang J., Liang Z., Peng Y., Wei L., Liu Y., Hu Y., Peng P., Wang J., Liu J., Chen Z., Li G., Zheng Z., Qiu S., Luo J., Ye C., Zhu S., Zhong N. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. . *N. Engl. J. Med.*. 382(18),1708-1720, 2020.
22. Li G., Fan Y., Lai Y., Han T., Li Z., Zhou P., Pan P., Wang W., Hu D., Liu X., Zhang Q., Wu J. Coronavirus infections and immune responses. *J.Med. Virology*. 92(4),424-432, 2020.
23. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Herrler T., Erichsen S., Schiergens T.S., Herrler G., Wu N.H., Nitsche A., Müller MA., Drosten C., Pöhlmann S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 181(2),271-280, 2020.
24. Prompetchara E., Ketloy C., Palaga T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 38(1),1-9, 2020.
25. Tsang H.F., Chan L., Cho W., Yu A., Yim A., Chan A., Ng L.P.W., Wong Y., Pei X., Li M., Wong S. An update on COVID-19 pandemic: the epidemiology, pathogenesis, prevention and treatment strategies. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 19(7), 877-888, 2021.
26. Li G., Fan Y., Lai Y., Han T., Li Z., Zhou P., Pan P., Wang W., Hu D., Liu X., Zhang Q., Wu J. Coronavirus infections and immune responses. *J.Med. Virol.* 92(4), 424-432, 2020.
27. Rothan H.A., Byraredy S.N. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J.Autoimmun.* 109,102433, 2020.
28. COVID-19 signs, symptoms and severity of disease: A clinician guide. *Government of Canada*. Updated June 17, 2021. <https://www.canada.ca/en/public-health/services/diseases/2019-novel-coronavirus-infection/guidance-documents/signs-symptoms-severity.html>
29. COVID 19 asintomática. *Cardiolatina Comunidad Iberoamericana De Cardiologia*. 2021.
30. How to Protect Yourself & Others. *European Centre for Disease Prevention and Control*. Updated 2021.
31. Soleimanpour S., Yaghoubi A. COVID-19 vaccine: where are we now and where should we go? *Expert Rev.Vaccines*. 20(1),23-44, 2021.
32. Diao B., Wang C., Tan Y., Chen X., Liu Y., Ning L., Chen L., Li M., Liu Y., Wang G., Yuan Z., Feng Z., Zhang Y., Wu Y., Chen Y. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front.Immunol*. 1,11:827, 2020.
33. Mascellino M.T., Di Timoteo F., De Angelis M., Oliva A. Overview of the Main Anti-SARSCoV-2 Vaccines: Mechanism of Action, Efficacy and Safety. *Infect. Drug Resist.* 14,3459-3476, 2021.
34. Understanding Viral Vector Covid-19 Vaccines. *Centers for Disease Control and Prevention*. Updated 2022.
35. Corum J., Zimmer C. How the Oxford-AstraZeneca Vaccine Works. *The New York Times*, 2021.
36. Sette A., Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*. 184(4),861-880, 2021.
37. COVID-19 mRNA vaccines. *Government of Canada*. 2020.
38. COVID-19 vaccination – Information on Comirnaty (Pfizer) COVID-19 vaccine. *Australian Government Department of Health*. Updated 2022.
39. Corum J., Zimmer C. How the Pfizer-BioNTech Vaccine Works. *The New York Times*. 2021.
40. Pfizer COVID-19 vaccine. *Health Navigator New Zealand*. Updated 2022. <https://www.healthnavigator.org.nz/medicines/c/covid-19-vaccines-overview/>
41. What are protein subunit vaccines and how could they be used against COVID-19? *Gavi the Vaccine Alliance*, 2020.
42. Cynthia A. Challener. Subunit Vaccines and the Fight Against COVID-19. *BioPharm Int*. 34(8),23-25, 2021.
43. Hadj Hassine I. Covid-19 vaccines and variants of concern: A review *Rev. Med. Virol.* e2313.. 2021
44. Heath P.T., Galiza E.P., Baxter D.N., Boffito M,

- Browne D., Burns F., Chadwick D.R., Clark R., Cosgrove C., Galloway J., Goodman A.L., Heer A., Higham A., Iyengar S., Jamal A., Jeanes C., Kalra P.A., Kyriakidou C., McAuley D.F., Meyrick A., Minassian A.M., Minton J., Moore P., Munsoor I., Nicholls H., Osanlou O., Packham J., Pretswell C.H., San Francisco Ramos A., Saralaya D., Sheridan R.P., Smith R., Soiza R.L., Swift P.A., Thomson E.C., Turner J., Viljoen M.E., Albert G., Cho I., Dubovsky F., Glenn G., Rivers J., Robertson A., Smith K., Toback S. Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* 385(13), 1172-1183, 2021.
45. Shinde V., Bhikha S., Hoosain Z., Archary M., Bhorat Q., Fairlie L., Laloo U., Masilela M.S.L., Moodley D., Hanley S., Fouche L., Louw C., Tameris M., Singh N., Goga A., Dheda K., Grobbelaar C., Kruger G., Carrim-Ganey N., Baillie V., de Oliveira T., Lombard Koen A., Lombaard J.J., Mngqibisa R., Bhorat A.E., Benadé G., Laloo N., Pitsi A., Vollgraaff P.L., Luabeya A., Esmail A., Petrick F.G., Oommen-Jose A., Foulkes S., Ahmed K., Thombrayil A., Fries L., Cloney-Clark S., Zhu M., Bennett C., Albert G., Faust E., Plested J.S., Robertson A., Neal S., Cho I., Glenn G.M., Dubovsky F., Madhi S.A. Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine against the B.1.351 Variant. *N. Engl. J. Med.* (20), 1899-1909, 2021.
46. Vaccine Safety Basics. Inactivated whole-cell (killed antigen) vaccines. *World Health Organization*. 2013. https://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0009/351927/WHO-Vaccine-Manual.pdf
47. Wang H., Zhang Y., Huang B., Deng W., Quan Y., Wang W., Xu W., Zhao Y., Li N., Zhang J., Liang H., Bao L., Xu Y., Ding L., Zhou W., Gao H., Liu J., Niu P., Zhao L., Zhen W., Fu H., Yu S., Zhang Z., Xu G., Li C., Lou Z., Xu M., Qin C., Wu G., Gao G.F., Tan W., Yang X. Development of an Inactivated Vaccine Candidate, BBIBP-CorV, with Potent Protection against SARSCoV-2. *Cell*. 182(3), 713-721, 2020.
48. Al Kaabi N., Zhang Y., Xia S., Yang Y., Al Qahtani M.M., Abdulrazzaq N., Al Nusair M., Hassany M., Jawad J.S., Abdalla J., Hussein S.E., Al Mazrouei S.K., Al Karam M., Li X., Yang X., Wang W., Lai B., Chen W., Huang S., Wang Q., Yang T., Liu Y., Ma R., Hussain Z.M., Khan T., Saifuddin Fasihuddin M., You W., Xie Z., Zhao Y., Jiang Z., Zhao G., Zhang Y., Mahmoud S., ElTantawy I., Xiao P., Koshy A., Zaher W.A., Wang H., Duan K., Pan A., Yang X. Effect of 2 Inactivated SARS-CoV-2 Vaccines on Symptomatic COVID-19 Infection in Adults: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 326(1), 35-45, 2021.
49. Ita K. Coronavirus Disease (COVID-19): Current Status and Prospects for Drug and Vaccine Development. *Arch. Med. Res.* 52(1), 15-24, 2021.
50. Correia I.R. Stability of IgG isotypes in serum. *MAbs*. (3), 221-32, 2010.
51. Warren T.K., Jordan R., Lo M.K., Ray A.S., Mackman R.L., Soloveva V., Siegel D., Perron M., Bannister R., Hui H.C., Larson N., Strickley R., Wells J., Stuthman K.S., Van Tongeren S.A., Garza N.L., Donnelly G., Shurtleff A.C., Retterer C.J., Gharai-beh D., Zamani R., Kenny T., Eaton B.P., Grimes E., Welch L.S., Gomba L., Wilhelmsen C.L., Nichols D.K., Nuss J.E., Nagle E.R., Kugelman J.R., Palacios G., Doerffler E., Neville S., Carra E., Clarke M.O., Zhang L., Lew W., Ross B., Wang Q., Chun K., Wolfe L., Babusis D., Park Y., Stray K.M., Trancheva I., Feng J.Y., Barauskas O., Xu Y., Wong P., Braun M.R., Flint M., McMullan L.K., Chen S.S., Fearn R., Swaminathan S., Mayers D.L., Spiropoulou C.F., Lee W.A., Nichol S.T., Cihlar T., Bavari S. Therapeutic efficacy of the small molecule GS-5734 against Ebola virus in rhesus monkeys. *Nature*. 531(7594), 381-5, 2016.
52. Majumder J., Minko T. Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19. *AAPS Journal*. 23(1), 14, 2021.
53. Lung J., Lin Y.S., Yang Y.H., Chou Y.L., Shu L.H., Cheng Y.C., Liu H.T., Wu C.Y. The potential chemical structure of anti-SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase. *J. Med. Virol.* 92(6), 693-697, 2020.
54. Jean S.S., Lee P.I., Hsueh P.R. Treatment options for COVID-19: The reality and challenges. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 53(3), 436-443, 2020.
55. Driggin E., Madhavan M.V., Bikdeli B., Chuich T., Laracy J., Biondi-Zoccai G., Brown T.S., Der Nigoghossian C., Zidar D.A., Haythe J., Brodie D.,

- Beckman J.A., Kirtane A.J., Stone G.W., Krumholz H.M., Parikh S.A. Cardiovascular Considerations for Patients, Health Care Workers, and Health Systems During the COVID-19 Pandemic. *J. Am. Coll. Cardiol.* 75(18),2352-2371, 2020.
56. Plantone D, Koudriavtseva T. Current and Future Use of Chloroquine and Hydroxychloroquine in Infectious, Immune, Neoplastic, and Neurological Diseases: A Mini-Review. *Clin Drug Investig.* 38(8):653-671. 57,2018.
 57. Devaux C.A., Rolain J.M., Colson P., Raoult D. New insights on the antiviral effects of chloroquine against coronavirus: what to expect for COVID-19? *Int. J. Antimicrob. Agents* 55(5), 105938, 2020.
 58. Dong L., Hu S., Gao J. Discovering drugs to treat coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Drug Discov. Ther.* 14(1),58-60, 2020.
 59. Colson P., Rolain J.M., Lagier J.C., Brouqui P., Raoult D. Chloroquine and hydroxychloroquine as available weapons to fight COVID-19. *Int. J. Antimicrob. Agents* 55(4), 105932, 2020.
 60. Shiraki K., Daikoku T. Favipiravir, an anti-influenza drug against life-threatening RNA virus infections. *Int. J. Infect. Dis.* 209,107512, 2020.
 61. McKee D.L., Sternberg A., Stange U., Laufer S., Naujokat C. Candidate drugs against SARSCoV-2 and COVID-19. *Pharmacol. Res.* 157,104859, 2020.
 62. Caly L., Wagstaff K.M., Jans D.A. Nuclear trafficking of proteins from RNA viruses: potential target for antivirals? *Antivir. Res.* 95(3),202-6, 2012.
 63. Caly L., Druce J.D., Catton M.G., Jans D.A., Wagstaff K.M. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antivir. Res.* 178,104787, 2020.
 64. Mishra S.K., Tripathi T. One year update on the COVID-19 pandemic: Where are we now? *Acta Tropica* 214,105778, 2021.
 65. Yadav A.K., Wen S., Xu X., Yu L. Antiviral treatment in COVID-19: which is the most promising?-a narrative review. *Ann. Palliat. Med.* 10(1),707-720, 2021.
 66. Pruijssers A.J., George A.S., Schäfer A., Leist S.R., Gralinski L.E., Dinno K.H. 3rd, Yount B.L., Agostini M.L., Stevens L.J., Chappell J.D., Lu X., Hughes T.M., Gully K., Martinez D.R., Brown A.J., Graham R.L., Perry J.K., Du Pont V., Pitts J., Ma B., Babusis D., Murakami E., Feng J.Y., Bilello J.P., Porter D.P., Cihlar T., Baric R.S., Denison M.R., Sheahan T.P. Remdesivir Inhibits SARS-CoV-2 in Human Lung Cells and Chimeric SARS-CoV Expressing the SARS-CoV2 RNA Polymerase in Mice. *Cell.* 32(3),107940, 2020.
 67. Lan X., Shao C., Zeng X., Wu Z., Xu Y. Lopinavir-ritonavir alone or combined with arbidol in the treatment of 73 hospitalized patients with COVID-19: A pilot retrospective study. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 59(5),378-385, 2021.
 68. Blaising J., Polyak S.J., Pécheur E.I. Arbidol as a broad-spectrum antiviral: an update. *Antivir. Res.* 107, 84-94, 2014.
 69. Li Y., Xie Z., Lin W., Cai W., Wen C., Guan Y., Mo X., Wang J., Wang Y., Peng P., Chen X., Hong W., Xiao G., Liu J., Zhang L., Hu F., Li F., Zhang F., Deng X., Li L. Efficacy and Safety of Lopinavir/Ritonavir or Arbidol in Adult Patients with Mild/Moderate COVID-19: An Exploratory Randomized Controlled Trial. *N. Y. State J. Med.* 1(1), 105-113.e4, 2020.
 70. Wang Z., Yang B., Li Q., Wen L., Zhang R. Clinical Features of 69 Cases With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis.* 71(15),769-777, 2020.
 71. Zhu Z., Lu Z., Xu T., Chen C., Yang G., Zha T., Lu J., Xue Y. Arbidol monotherapy is superior to lopinavir/ritonavir in treating COVID-19. *J. Infect.* 81(1):e21-e23, 2020.
 72. Charles Patrick Davis. Medical Definition of Antibody. *MediciNet*. 2021.
 73. Dictionary of Cancer Terms 'Antibody'. *National Cancer Institute*. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/search/antibody/?searchMode=Contains>
 74. Sara Tiner. Monoclonal Antibodies: Update on this COVID-19 Experimental Therapy. *Mayo Clinic's Research Magazine. Discovery's Edge*. 2021.
 75. Life Science Research 'Antibodies'. *Merck*. 2021. <https://www.merckgroup.com/en/annual-report/2021/management-report/funda->

- [mental-information-about-the-group/merck-life-science.html](https://www.merck-life-science.com/mental-information-about-the-group/merck-life-science.html)
76. Corti D., Purcell L.A., Snell G., Veessler D. Tackling COVID-19 with neutralizing monoclonal antibodies. *Cell*. 184(12),3086-3108, 2021.
 77. Chen J., Huang R., Nie Y., Wen X., Wu Y. Human Monoclonal Antibodies: On the Menu of Targeted Therapeutics Against COVID-19. *Viol. Sin.* 35(6),713-724, 2020.
 78. Ju B., Zhang Q., Ge J., Wang R., Sun J., Ge X., Yu J., Shan S., Zhou B., Song S., Tang X., Yu J., Lan J., Yuan J., Wang H., Zhao J., Zhang S., Wang Y., Shi X., Liu L., Zhao J., Wang X., Zhang Z., Zhang L. Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Nature*. 584(7819),115-119, 2020.
 79. Walls A.C., Xiong X., Park Y.J., Tortorici M.A., Snijder J., Quispe J., Cameroni E., Gopal R., Dai M., Lanzavecchia A., Zambon M., Rey F.A., Corti D., Veessler D. Unexpected Receptor Functional Mimicry Elucidates Activation of Coronavirus Fusion. *Cell*. 176(5),1026-1039.e15, 2019.
 80. Roesch T., Rodriguez L. A Review of the Currently Available Monoclonal Antibodies for COVID-19. *Contagion* 6(5), 2021.
 81. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Emergency Use. 2020. <https://www.fda.gov/media/146255/download>
 82. Elsevier's Drug Information. Bamlanivimab; etesevimab. 2022. <https://elsevier.health/en-US/preview/bamlanivimab-etesevimab#mechanism-of-action>
 83. Gottlieb R.L., Nirula A., Chen P., Boscia J., Heller B., Morris J., Huhn G., Cardona J., Mocherla B., Stosor V., Shawa I., Kumar P., Adams A.C., Van Naarden J., Custer K.L., Durante M., Oakley G., Schade A.E., Holzer T.R., Ebert P.J., Higgs R.E., Kallewaard N.L., Sabo J., Patel D.R., Klekotka P., Shen L., Skovronsky D.M. Effect of Bamlanivimab as Monotherapy or in Combination with Etesevimab on Viral Load in Patients With Mild to Moderate COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 325(7),632-644, 2021.
 84. Planas D., Veyer D., Baidaliuk A., Staropoli I., Guivel-Benhassine F., Rajah M.M., Planchais C., Porrot F., Robillard N., Puech J., Prot M., Gallais F., Gantner P., Velay A., Le Guen J., Kassis-Chikhani N., Edriss D., Belec L., Seve A., Courtellemont L., Péré H., Hocqueloux L., Fafi-Kremer S., Prazuck T., Mouquet H., Bruel T., Simon-Lorière E., Rey F.A., Schwartz O. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature* (7871),276-280, 2021.
 85. Food and Drug Administration. FDA authorizes bamlanivimab and etesevimab monoclonal antibody therapy for post-exposure prophylaxis (prevention) for COVID-19. 2021. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-authorizes-bamlanivimab-and-etesevimab-monoclonal-antibody-therapy-post-exposure-prophylaxis>
 86. Anti-SARS-CoV-2 Monoclonal Antibodies. COVID-19 Treatment Guidelines. National Institute of Health. <https://www.covid19treatment-guidelines.nih.gov>
 87. Elsevier. Drug Monograph. Casirivimab; imdevimab. 2022. <https://elsevier.health/en-US/preview/casirivimab#mechanism-of-action>
 88. Fact sheet for healthcare providers emergency use authorization (EUA) of sotrovimab. <https://www.fda.gov/media/149534/download>
 89. Product monograph including patient medication information Sotrovimab for injection https://ca.gsk.com/media/6589/sotrovimab_pm_pmionly_en.pdf
 90. Elsevier. Drug Monograph. Sotrovimab. <https://elsevier.health/en-US/preview/sotrovimab>
 91. Deng R., Jin F., Prabhu S., Iyer S. Monoclonal antibodies: what are the pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations for drug development? *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 8(2),141-60, 2020.
 92. Lobo E.D., Hansen R.J., Balthasar J.P. Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J.Pharm. Sci.* 93(11), 2645-68, 2004.
 93. Richter W.F., Bhansali S.G., Morris M.E. Mechanistic determinants of biotherapeutics absorption following SC administration. *AAPS*. 14(3), 559-70, 2012.
 94. Swartz M.A. The physiology of the lymphatic sys-

- tem. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 50(1-2),3-20, 2021.
95. Gibney M.A., Arce C.H., Byron K.J., Hirsch L.J. Skin and subcutaneous adipose layer thickness in adults with diabetes at sites used for insulin injections: implications for needle length recommendations. *Curr. Med. Res. Opin.* 26(6),1519-30, 2010.
 96. Ryman J.T., Meibohm B. Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* 6(9),576-588, 2017.
 97. Zhao L., Ji P., Li Z., Roy P., Sahajwalla C.G. The antibody drug absorption following subcutaneous or intramuscular administration and its mathematical description by coupling physiologically based absorption process with the conventional compartment pharmacokinetic model. *J. Clin. Pharmacol.* 53(3),314-25, 2013.
 98. Kamath A.V. Translational pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies. *Drug Discov Today Technol.* 21-22,75-83, 2016.
 99. Wang W., Wang E.Q., Balthasar J.P. Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 84(5),548-58, 2008.
 100. Liu L. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *Protein Cell.* 9(1),15-32, 2018.
 101. Cooper P.R., Ciambrone G.J., Kliwinski C.M., Maze E., Johnson L., Li Q., Feng Y., Hornby P.J. Efflux of monoclonal antibodies from rat brain by neonatal Fc receptor, FcRn. *Brain Res.* 1534,13-21, 2013.
 102. Shah D.K., Betts A.M. Antibody biodistribution coefficients: inferring tissue concentrations of monoclonal antibodies based on the plasma concentrations in several preclinical species and human. *MAbs.* 5(2),297-305, 2013.
 103. Berdeja J., Jagannath S., Zonder J., Badros A., Kaufman J.L., Manges R., Gupta M., Tendolkar A., Lynch M., Bleickardt E., Paliwal P., Vij R. Pharmacokinetics and Safety of Elotuzumab Combined With Lenalidomide and Dexamethasone in Patients With Multiple Myeloma and Various Levels of Renal Impairment: Results of a Phase Ib Study. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 16(3),129-38, 2016.
 104. Waldmann T.A., Strober W., Mogielnicki R.P. The renal handling of low molecular weight proteins. II. Disorders of serum protein catabolism in patients with tubular proteinuria, the nephrotic syndrome, or uremia. *J. Clin. Investig.* 51(8), 2162-74, 1972.
 105. Yang B.B., Lum P., Chen A., Arends R., Roskos L., Smith B., Pérez Ruixo J.J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic perspectives on the clinical drug development of panitumumab. *Clin. Pharmacokinet.* 49(11),729-40, 2010.
 106. Product monograph including patient medication information. Bamlanivimab for injection Solution for infusion, 700 mg/20 mL (35 mg/mL) Anti-SARS-CoV-2 spike protein monoclonal antibody. <http://pi.lilly.com/ca/bamlanivimab-capm.pdf>
 107. Chigutsa E., O' Brien L., Ferguson-Sells L., Long A., Chien J. Population Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Neutralizing Antibodies Bamlanivimab and Etesevimab in Patients with Mild to Moderate COVID-19 Infection. *Clin. Pharmacol. Ther.* 110(5),1302-1310, 2021.

In silico Προγνωστικές Μέθοδοι Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων και Τοξικότητας Παραγώγων Προπαργυλαμίνης, Αναστολέων της Μονοαμινοοξειδάσης

Παναγιώτ Μανροειδή¹, Νικήτας Γεωργίου¹, Αφροδίτη Βογιατζάκη¹, Αναστασία Μαρία Κούβαρη¹, Ελένη Σίσκου¹, Γιώργος Αποστολόπουλος¹, Νικόλαος Τζούρας¹, Σταύρος Π. Νεοφώτιστος¹, Γιώργος Χ. Βουγιουκαλάκης¹, Άννα Τσαντίλη-Κακουλίδου*, Θωμάς Μαυρομούστακος^{1*}

¹Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Χημείας, Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Πανεπιστημιούπολη, Τ.Κ. 15784, Ζωγράφου, Αθήνα, Ελλάδα.

KEYWORDS:

SwissADME, pkCSM, preADMET, Φαρμακοκινητική, φαρμακο-ομοιότητα, τοξικότητα, οικοτοξικότητα.

Article Info:

Received: March 15, 2022.

Revised: May 17, 2022

Accepted: May 20, 2022

published on line: July, 19, 2022

* ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΓΡΑΦΙΑ:

Θ. Μαυρομούστακος

e-mail: tmavrom@chem.uoa.gr

Άννα Τσαντίλη-Κακουλίδου,

e-mail: tsantili@pharm.uoa.gr

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φαρμακευτικά μόρια συναντούν πολλά εμπόδια στην προσπάθεια τους να περάσουν τους βιολογικούς φραγμούς και να φθάσουν το όργανο στόχο και τον υποδοχέα, ώστε να ασκήσουν την επιθυμητή βιολογική δράση. Κατά συνέπεια, η ανάπτυξη νέων υποψηφίων φαρμάκων απαιτεί πολυ-παραγοντικό σχεδιασμό, με την φαρμακοκινητική συμπεριφορά και την τοξικότητα να ερευνώνται παράλληλα με τη βιολογική δράση. Η ανάπτυξη λογισμικών ελεύθερης πρόσβασης για την πρόβλεψη των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων και της τοξικότητας των νέων φαρμακομορίων ως αποτέλεσμα συστηματικών μελετών QSAR/QSPR και της χρήσης χημειομετρίας, σε μεγάλο αριθμό διαθέσιμων πειραματικών δεδομένων, αποτελεί ένα ισχυρότατο εργαλείο στη φαρέτρα των φαρμακοχημικών για να προχωρήσουν στον βέλτιστο πολυ-παραγοντικό σχεδιασμό. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται τρία διαφορετικά λογισμικά ελεύθερης πρόσβασης για την εκτίμηση της φαρμακο-ομοιότητας, του φαρμακοκινητικού προφίλ και της τοξικότητας τεσσάρων παραγώγων προπαργυλαμίνης, τα οποία έχουν συντεθεί με πιθανή δράση κατά της νόσου Alzheimer. Όλες οι ενώσεις εμφάνισαν ικανοποιητικό προφίλ φαρμακο-ομοιότητας. Σύμφωνα με τις προβλέψεις εμφανίζουν υψηλή γαστρεντερική απορρόφηση και διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Εκτιμάται ωστόσο ότι οι ενώσεις είναι ηπατοτοξικές ενώ διαφοροποιημένα μεταξύ των λογισμικών είναι τα αποτελέσματα για μεταλλαξιογόνο δράση.

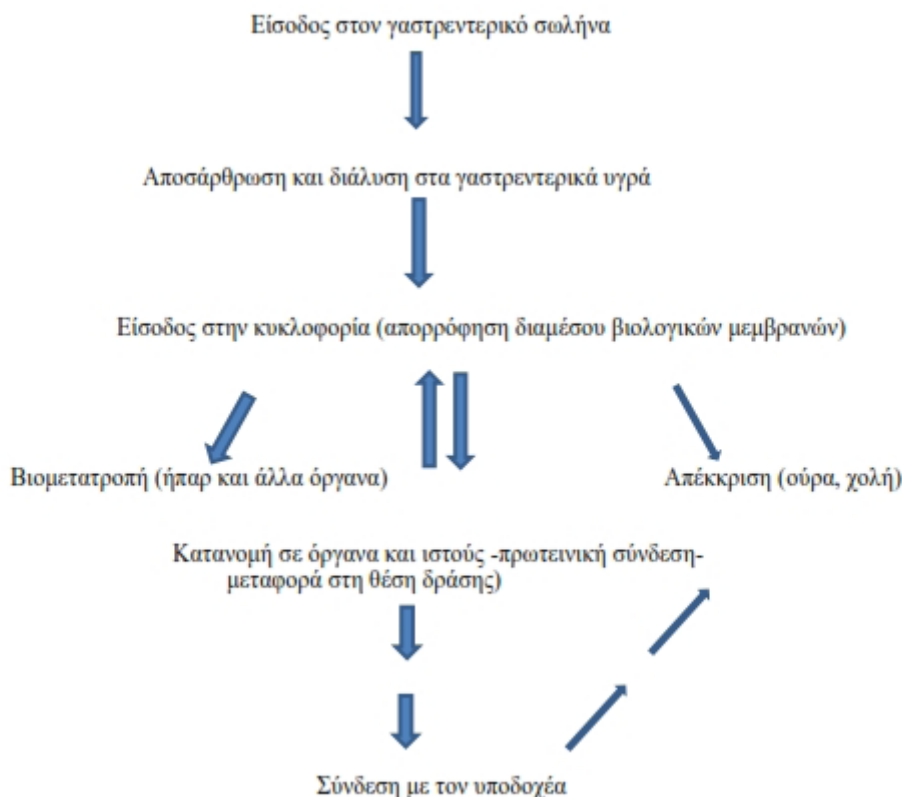
1.Εισαγωγή

Ένα φάρμακο κατά την πορεία στο όργανο στόχος και τον υποδοχέα, συναντά πολλά εμπόδια και πρέπει να περάσει διαφορούς βιολογικούς φραγμούς. Ταυτόχρονα, αρχίζει η βιομετατροπή του και η απομάκρυνση του από τον οργανισμό. Οι διεργασίες που αφορούν στην απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμό και απέκκριση των φαρμάκων χαρακτηρίζονται ως ιδιότητες ADME (ακρωνύμιο των όρων Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination) και συνιστούν τη φαρμακοκινητική

φάση που καθορίζει τη βιοδιαθεσιμότητα και τη δυνατότητα του φαρμάκου να φθάσει στον υποδοχέα και να ασκήσει τη δράση του. Επι πλέον δεν αρκεί το φάρμακο να είναι δραστικό και βιοδιαθέσιμο, πρέπει να είναι και ασφαλές. Κατά συνέπεια οι μη ικανοποιητικές φαρμακοκινητικές ιδιότητες και η τοξικότητα αποτελούν βασικούς λόγους για τον αποκλεισμό των υποψηφίων φαρμακομορίων από την περαιτέρω κλινική έρευνα^{1,2}. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 1 το βέλτιστο αποτέλεσμα κατά την ιεράρχηση των υποψηφίων φαρμακομορίων βόσκεται στο κοινό υποσύνολο όπου συναντώ-



Σχήμα 1: Βελτιστοποίηση υποψηφίων φαρμάκων ως συνισταμένη βιολογικής δράσης, φαρμακοκινητικής και ασφάλειας



Σχήμα 2: Πορεία του φαρμάκου προς το όργανο-στόχο και απέκκριση από τον οργανισμό

νται ικανοποιητική βιολογική δράση, ικανοποιητική αποτελεσματικότητα που καθορίζεται από τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες και ικανοποιητική ασφάλεια (Σχήμα 2).

Σε πρώιμο στάδιο η έρευνα αυτή είναι δυνατόν να βασιστεί σε *in silico* μεθόδους. Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούν στατιστικά μοντέλα πρόβλεψης (μοντέλα QSAR/QSPR) που βασίζονται στις φυσικοχημικές και μοριακές ιδιότητες των ενώσεων και έχουν προκύψει από μεγάλο αριθμό πειραματικών δεδομένων. Τα μοντέλα αυτά ενσωματώνονται σε κατάλληλα λογισμικά, ορισμένα από τα οποία είναι ελεύθερης πρόσβασης στο διαδίκτυο ³

Μεταξύ των φυσικοχημικών ιδιοτήτων η λιποφιλία των μορίων, εκφραζόμενη με τον συντελεστή μερισμού στο σύστημα οκτανόλης/νερού (logP) έχει πρωτεύουσα σημασία επηρεάζοντας τόσο τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες και τη τοξικότητα όσο και τη σύνδεση με τα μακρομόρια και τον υποδοχέα. Ως εκ τούτου η ιδιότητα αυτή περιλαμβάνεται ως παράμετρος στην πλειοψηφία των μοντέλων, τα οποία χρησιμοποιούν διαφορετικά υπολογιστικά συστήματα για την εκτίμηση της ^{4,5}

Στις επόμενες ενότητες θα αναλυθεί εν συντομία η σημασία συγκεκριμένων φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων και δεικτών τοξικότητας για την αξιολόγηση του προφίλ υποψηφίων φαρμακομορίων στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης και η δυνατότητα πρόβλεψής τους μέσω ελεύθερης πρόσβασης λογισμικών.

1.1 Φαρμακο-ομοιότητα-Ιδιότητες ADME

Έχουν προταθεί ορισμένοι απλοί κανόνες που ορίζουν τη φαρμακο-ομοιότητα των μορίων και δυνητικά ευνοούν την απορρόφηση από βιολογικούς φραγμούς ⁶. Ο πρώτος και ακόμη ευρέως χρησιμοποιούμενος κανόνας είναι ο κανόνας του Lipinski γνωστός ως κανόνας του πέντε (Rule of five, Ro5)⁷, ο οποίος εφαρμόζεται για ενώσεις που προορίζονται από του στόματος χορήγηση. Ονομάζεται κανόνας του πέντε, επειδή οι αριθμοί για τις ιδιότητες που εμπλέκονται στον κανόνα αποτελούν πολλαπλάσια του πέντε. Συγκεκριμένα:

- Το μοριακό βάρος της υποψήφιας ένωσης πρέπει να είναι μικρότερο του 500 (5X100)

- Η λιποφιλία πρέπει να έχει τιμή logP μικρότερη του 5

- Δεν πρέπει να περιέχει περισσότερες από 5 ομάδες οι οποίες να είναι δότες δεσμού υδρογόνου (HBD)

- Δεν πρέπει να περιέχει περισσότερες από 10 (2X5) ομάδες δέκτες δεσμού υδρογόνου (HBA).

Στον κανόνα του Lipinski η λιποφιλία υπολογίζεται με τη χρήση του λογισμικού ClogP, που στηρίζεται στην μέθοδο των θραυσμάτων ⁵.

Τα όρια του κανόνα του Lipinski αφορούν σε ευνοϊκά χαρακτηριστικά για τη γαστρεντερική απορρόφηση. Τα μόρια αυτά δεν πρέπει να συνδυάζουν περισσότερες από δυο παραβιάσεις του κανόνα. Η βαθμολογία δηλαδή (Ro5 score) πρέπει να είναι μικρότερη του 2 και αποτελεί επίσης χαρακτηριστικό φαρμακο-ομοιότητας.

Μετα από τον Lipinski και άλλοι ερευνητές έθεσαν κανόνες φαρμακο-ομοιότητας, ενσωματώνοντας και άλλες μοριακές ιδιότητες. Οι Veber και συν ⁸ προτείνουν όρια που αφορούν στην πολικότητα και ευκαμψία των μορίων όπως εκφράζονται με το Εμβαδόν Πολικής Επιφάνειας (Polar Surface Area) ή την ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου και τον αριθμό περιστρεφόμενων δεσμών (Rotatable Bonds) αντίστοιχα. Σύμφωνα με τον Veber πρέπει τα μόρια να συμμορφώνονται με τα ακόλουθα όρια:

- Εμβαδόν Πολικής Επιφάνειας <140 Å² και περιστρεφόμενοι δεσμοί <10 ή

- Σύνολο δοτών και δεκτών σε δεσμούς υδρογόνου ≤12 και περιστρεφόμενων δεσμών ≤10.

Οι Ghose και συν ⁹ του καθόρισαν εύρη τιμών για το μοριακό βάρος και τη λιποφιλία, την οποία υπολογίζουν με βάση το σύστημα ατομικών συνεισφορών AlogP¹⁰. Επίσης συμπεριλαμβάνουν τη μοριακή διαθλασιμότητα ¹¹ και τον συνολικό αριθμό ατόμων στο μόριο στον κανόνα φαρμακο-ομοιότητας. Σύμφωνα με τους συγγραφείς αυτούς τα υποψήφια φαρμακομόρια θα πρέπει να βρίσκονται μεταξύ των εξής ορίων :

160 ≤ μοριακό βάρος ≤ 480

-0.4 ≤ ALOGP ≤ 5.6

40 Å³ ≤ MR (molecular refractivity, μοριακή διαθλασιμότητα) ≤ 130 Å³

$20 \leq$ συνολικός αριθμός ατόμων ≤ 70 .

Αν και στους κανόνες φαρμακο-ομοιότητας δεν συμπεριλαμβάνεται η διαλυτότητα, η ιδιότητα αυτή είναι επίσης κρίσιμη για την γαστρεντερική απορρόφηση δεδομένου ότι για να αρχίσει η διεργασία της απορρόφησης πρέπει πρώτα η δραστική ένωση να διαλυθεί στα γαστρεντερικά υγρά (Σχήμα 1). Η διαλυτότητα αποτελεί μαζί με τη διαπερατότητα τις συνιστώσες που αποτελούν το Βιοφαρμακευτικό Σύστημα Ταξινόμησης (Biopharmaceutical Classification System, BCS)¹².

Οι κανόνες φαρμακο-ομοιότητας είναι χρήσιμα εργαλεία για μια κατ'αρχήν αξιολόγηση των υποψηφίων φαρμακο-μορίων. Περαιτέρω ποσοτική εκτίμηση της γαστρεντερικής απορρόφησης *in vivo* είναι δυνατή μέσω στατιστικών μοντέλων ορισμένα από τα οποία έχουν ενσωματωθεί σε ελεύθερης πρόσβασης λογισμικά. Στα μοντέλα αυτά η λιποφιλία, το μοριακό βάρος και η πολικότητα έχουν καθοριστική συνεισφορά³.

Γαστρεντερική Απορρόφηση .

Η γαστρεντερική απορρόφηση *in vivo*, εκφραζόμενη ως %HOA (% Human Oral Absorption) ή %HIA (Human Intestinal Absorption) είναι δυνατόν να εκτιμηθεί στη βάση στατιστικών μοντέλων που χρησιμοποιούν πειραματικά δεδομένα και βασίζονται σε φυσικοχημικές/μοριακές ιδιότητες. Η λιποφιλία, το μοριακό βάρος και παράμετροι πολικότητας αποτελούν τις πιο σημαντικές ιδιότητες στα μοντέλα σε συμφωνία και με τους προαναφερθέντες κανόνες φαρμακο-ομοιότητας³.

Έχουν επίσης αναπτυχθεί πειραματικές διατάξεις για τον προσδιορισμό της απορρόφησης *in vitro*. Μεταξύ αυτών ευρεία εφαρμογή έχουν οι κυτταρικές σειρές Caco-2, οι οποίες προέρχονται από μονοστιβάδες κυττάρων αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου και θεωρούνται ότι προσομοιώνουν το εντερικό επιθήλιο¹³. Το μοντέλο Caco-2 έχει καθιερωθεί ως gold standard για τη διαπερατότητα του γαστρεντερικού σωλήνα και συνιστάται από το US FDA για την ταξινόμηση σύμφωνα με σύστημα BCS¹⁴. Caco-2 διαπερατότητα $P_{app} > 10 \times 10^{-6}$ cm/sec αντιστοιχεί σε επαρκή γαστρεντερική απορρόφηση,

ενώ $P_{app} < 10 \times 10^{-6}$ cm/sec υποδηλώνει γαστρεντερική απορρόφηση $< 20\%$. Η ευρεία αποδοχή των σειρών Caco-2 έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη αντίστοιχων μοντέλων πρόβλεψης.

Διαπερατότητα από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό: Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός (ΑΕΦ) (BBB-Blood Brain Barrier) αποτελεί το κύριο εμπόδιο για την είσοδο των φαρμάκων στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα. Ο ΑΕΦ είναι λιπόφιλος φραγμός ισχυρών απαιτήσεων και συνίσταται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων με περίπλοκο δίκτυο από στενές συνδέσεις και πόδια αστροκυττάρων που ακουμπούν στο ενδοθήλιο και τη βασική του μεμβράνη¹⁵. Για τη διαπερατότητα του ΑΕΦ έχουν προταθεί αυστηρότεροι κανόνες φαρμακο-ομοιότητας ως προς το μοριακό βάρος (< 400), τη λιποφιλία και το αριθμό των ατόμων N και O, όπου $N+O \leq 5$ και $\text{ClogP}-(N+O) > 0$. Επίσης προτείνεται κατώτερο όριο για το εμβαδόν πολικής επιφάνειας (PSA) $90 \text{ \AA}^2$ ή κατ' άλλους $60-70 \text{ \AA}^2$ ¹⁶. Αναφέρονται επίσης μοντέλα για την πρόβλεψη της διαπερατότητας του ΑΕΦ, η οποία εκφράζεται συνήθως ως ο λογάριθμος του λόγου της συγκέντρωσης στον εγκέφαλο (brain) προς τη συγκέντρωση στο πλάσμα (logBB)

$\log BB = \log \frac{\text{εγκέφαλος}}{\text{πλάσμα}}$

Μόρια με τιμές $\log BB > 0,3$ θεωρούνται ότι περνούν ικανοποιητικά τον ΑΕΦ, ενώ για μόρια με $\log BB < -1$ η διαπερατότητα είναι πολύ περιορισμένη. Τα όρια αυτά χρησιμοποιούνται για την ταξινόμηση των φαρμάκων που δρουν στο ΚΝΣ¹⁷.

Μεταβολισμός από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450:

Ο μεταβολισμός των φαρμακομορίων κυρίως από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (cytochrome Cyp450) στο ήπαρ στοχεύει στη δημιουργία πολικότερων μορίων ώστε να απεκκρίνονται ευκολότερα¹⁸. Η βιομετατροπή συνήθως οδηγεί σε αδρανείς μεταβολίτες. Ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις σχηματίζονται τοξικοί μεταβολίτες ενώ είναι δυνατόν ο μεταβολισμός να ευθύνεται και για αλληλεπιδράσεις συγχορηγούμενων φαρμάκων. Ως εκ τούτου ο μεταβολισμός σχετίζεται τόσο με την αποτελεσματικότητα όσο και με την ασφάλεια του φαρμάκου¹⁹. Δεδομένου και του πολυμορφισμού που παρατη-

ρείται για ορισμένες ισομορφές του P450, η έγκαιρη διερεύνηση της αναστολής ή της επαγωγής των ενζύμων P450, ειδικότερα των ισομορφών CYP3A4, CYP2D6, CYP1A2 και CYP2E1 είναι ιδιαίτερα σημαντική.

Σύνδεση με την p-γλυκοπρωτεΐνη (p-glycoprotein, p-gr)

Η p-γλυκοπρωτεΐνη αποτελεί αντλία εκροής από το κύτταρο επηρεάζοντας την απορρόφηση των φαρμάκων που αποτελούν υποστρώματα. Υπερεκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη αντοχής στη θεραπεία. Η p-gr μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στη γαστρεντερική απορρόφηση και ιδιαίτερα στη διαπερατότητα του ΑΕΦ, όπου λειτουργεί ως 'φύλακας' του φραγμού (gatekeeper)^{20,21}. Επαγωγή ή αναστολή της p-gr είναι επίσης δυνατόν να οδηγήσει σε αλληλεπιδράσεις φαρμάκων²². Για τους ανωτέρω λόγους η συμπεριφορά των φαρμακομορίων ως προς την p-gr διερευνάται ήδη από τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης και η πρόβλεψη της περιλαμβάνεται σε πολλά λογισμικά.

Πρωτεϊνική Σύνδεση %PPB

Η σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος και των ιστών (κυρίως την αλβουμίνη και την α-όξινη γλυκοπρωτεΐνη) επηρεάζει την κατανομή του φαρμάκου και την αποτελεσματικότητά του δεδομένου ότι μόνο η μη συνδεδεμένη μορφή περνάει τις μεμβράνες και αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα. Επι πλέον η πρωτεϊνική σύνδεση εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις φαρμάκων. Έχουν αναπτυχθεί πολλά μοντέλα για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης, η οποία συνήθως εκφράζεται ως % PPB, αλλά και ως μη συνδεδεμένο κλάσμα (fraction in bound, fu), δεδομένου ότι αυτό επηρεάζει την αποτελεσματικότητά³.

1.2 Τοξικότητα:

Δοκιμή Ames

Η δοκιμή Ames χρησιμοποιείται στη πρόωμη φάση για τον έλεγχο της μεταλλαξιογενεσης που μπο-

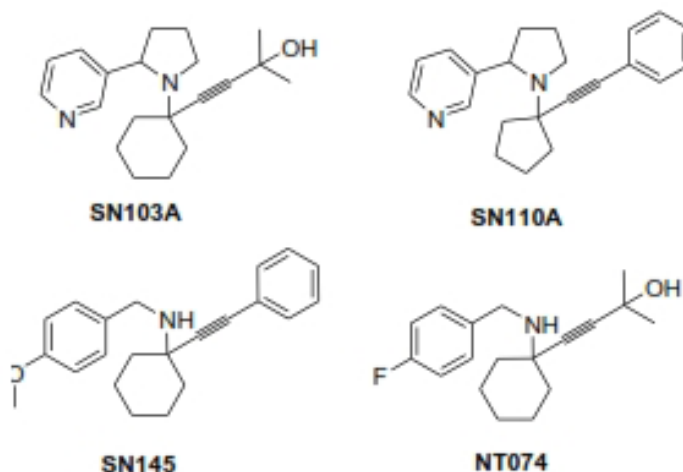
ρεί να ευθύνεται για καρκινογόνο δράση²³. Η δοκιμή Ames χρησιμοποιεί στελέχη των βακτηρίων *Salmonella typhimurium*/E. *Coli* και παρατηρούνται τυχόν μεταλλάξεις που μπορεί να προκαλέσει μια χημική ένωση στο DNA τους. Θετικό αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι η ένωση είναι μεταλλαξιογόνος. Η δοκιμή Ames εφαρμόζεται για τη γρήγορη κατ' αρχήν εκτίμηση της καρκινογόνου δράσης, δεδομένου ότι ο αντίστοιχος έλεγχος σε μοντέλα ζώων είναι χρονοβόρος και δαπανηρός. Ωστόσο είναι δυνατόν να προκύψουν ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

Αναστολή διαύλων hERG

Η αναστολή των διαύλων καλίου που κωδικοποιούνται από το γονίδιο hERG (human Ether-à-go-go-Related Gene) αποτελεί κύρια αιτία καρδιοτοξικότητας, οφειλόμενης στην ανάπτυξη του συνδρόμου επίκτητου μακρού QT, το οποίο ανιχνεύεται με ηλεκτροκαρδιογράφημα και που οδηγεί σε θανατηφόρο αρρυθμία²⁴. Η αναστολή των διαύλων hERG επομένως αποτελεί ανεπιθύμητη ιδιότητα των φαρμάκων και ελέγχεται επίσης σε πρόωμη φάση. Απλοί κανόνες για μειωμένη αναστολή hERG προτείνουν $MW < 400$ and $cLog P < 4$ ή $MW > 400$ and $log P > 4$. Ο κανόνας $MW < 400$ and $cLog P < 4$ συμφωνεί και με ευνοϊκές ιδιοτητες ADMET, εκτός από τη διαπερατότητα του ΑΕΦ. Μειωμένη βασικότητα επίσης μειώνει τον κίνδυνο αναστολής hERG²⁴.

Ηπατοτοξικότητα

Η ηπατοτοξικότητα που επάγεται από τη χρήση φαρμάκων (drug-induced liver injury -DILI) αποτελεί πολύ σοβαρή ανεπιθύμητη ενέργεια²⁵. Τα τελευταία χρόνια έχει δημιουργηθεί ειδική ιστοσελίδα προσβάσιμη στο κοινό LiverTox (<http://livertox.nlm.nih.gov>) όπου παρέχονται σχετικές πληροφορίες και υπάρχει ιδιαίτερη δραστηριοποίηση των ερευνητών στην ανάπτυξη μοντέλων πρόβλεψης. Η ανάπτυξη των μοντέλων στηρίζεται σε μεθόδους μηχανικής μάθησης (machine learning) και ορισμένα είναι ενσωματωμένα σε λογισμικά ελεύθερης πρόσβασης²⁶.



Σχήμα 3: Δομές των υπό μελέτη ενώσεων

Ευαισθησία στο δέρμα

Τα φάρμακα από τη στιγμή της κυκλοφορίας τους διαχειρίζονται επιστήμονες υγείας και άλλοι εργαζόμενοι οι οποίοι ενδεχομένως έρχονται σε κίνδυνο από τη συχνή επαφή με αυτά. Η ευαισθησία στο δέρμα αποτελεί ένα συχνό κίνδυνο από επανειλημμένη έκθεση σε χημικά και ως εκ τούτου πρέπει και στην περίπτωση των φαρμακομορίων να ελέγχεται ήδη από τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξής τους²⁷. Η ευαισθησία στο δέρμα επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, μεταξύ αυτών και από τη διαπερατότητα από το δέρμα. Η αυξανόμενη τάση για περιορισμό των πειραμάτων σε ζώα έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη μοντέλων πρόβλεψης κατηγοριοποίησης, τα οποία ενσωματώνονται σε κατάλληλα λογισμικά^{28,29}.

1.3. Οικοτοξικότητα

Τα τελευταία χρόνια έχουν θεσπιστεί αυστηρότερα κριτήρια και ως προς την περιβαλλοντική συμπεριφορά των φαρμάκων, δεδομένου ότι κατά την απέκκριση τους θα αποδοθούν στο περιβάλλον και ιδιαίτερα μέσω των λυμάτων στο υδάτινο περιβάλλον³⁰. Για τον έλεγχο της υδατι-

κής τοξικότητας (aquatic toxicity) τρία τροφικά επίπεδα: φύκη ή φυτά, ασπόνδυλα και σπονδυλωτά³¹. Μεταξύ των ασπονδύλων το πρωτόζωο *Tetrahymena Pyriformis* αποτελεί ένα από τα πρώτα και ιδιαίτερα δημοφιλείς μοντέλο για τον προσδιορισμό τελικού σημείου (endpoint) υδατικής τοξικότητας³². Τα σπονδυλωτά που χρησιμοποιούνται είναι κυρίως ιχθύες. Μεταξύ αυτών η χονδροκέφαλη τσίμα (Fathead Minnow) βρίσκει ευρεία εφαρμογή ως μοντέλο υδατικής τοξικότητας³³. Χημειομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων των ζωικών μοντέλων έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη μοντέλων ορισμένα από τα οποία συνιστά επίσης ο ΟΟΣΑ και ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων με στόχο τη μείωση του κόστους και του απαιτούμενου χρόνου καθώς και τον περιορισμό των πειραμάτων σε ζώα³⁴.

Σκοπός της Μελέτης.

Με βάση τη σύντομη αυτή ανασκόπηση θεωρήσαμε ενδιαφέρον να διερευνήσουμε *in silico* το προφίλ φαρμακο-ομοιότητας, ιδιοτήτων ADME, και τοξικότητας/οικοτοξικότητας τεσσάρων νέων ενώσεων, παραγώγων προπαργουλαμίνης, οι οποίες έχουν συντεθεί στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, του

Τμήματος Χημείας Ε.Κ.Π.Α. ως δυνάμει φαρμακευτικά μόρια κατά της ασθένειας Alzheimer. Χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά ελεύθερης πρόσβασης λογισμικά, τα οποία συγκεντρώνουν προβλέψεις για τις προαναφερθείσες ιδιότητες.

2. Υλικά και Μέθοδοι

Τα υπό μελέτη μόρια, παράγωγα προπαργυλαμίνης, παρουσιάζονται στο Σχήμα 2. Η σύνθεση και ταυτοποίηση των ενώσεων περιγράφονται στις βιβλιογραφικές παραπομπές^{35,36}.

Χρησιμοποιήθηκαν τρία λογισμικά ελεύθερης πρόσβασης: (I) SwissADME 37, διαθέσιμο στη διαδικτυακή διεύθυνση <http://www.swissadme.ch> (II) pkCSM 38, διαθέσιμο στη διαδικτυακή διεύθυνση <http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsml/prediction> και (III) preADMET³⁹, διαθέσιμο στη διαδικτυακή διεύθυνση <https://preadmet.webservice.bmdrc.org/>

Το λογισμικό SwissADME συγκεντρώνει τις πιο σημαντικές υπολογιστικές μεθόδους για την εκτίμηση του ολικού φαρμακοκινητικού προφίλ μικροορίων. Οι ενσωματωμένες μέθοδοι έχουν επικυρωθεί ως προς τη σταθερότητα, αξιοπιστία και την ευκολία στην ερμηνεία τους για την εφαρμογή τους στο σχεδιασμό φαρμάκων³⁷. Το λογισμικό SwissADME υπολογίζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες που σχετίζονται με την φαρμακο-ομοιότητα, καθώς επίσης τη γαστρεντερική απορρόφηση, τη διαπερατότητα του ΑΕΦ, τη διαπερατότητα κυττάρων Caco-2 και την αναστολή /συγγένεια ισοενζύμων του P450. Για τη μεγαλύτερη αξιοπιστία των υπολογισμών της λιποφιλίας το λογισμικό χρησιμοποιεί πέντε μεθόδους με διαφορετική προσέγγιση. Συγκεκριμένα μια μέθοδο ατομικών συνεισφορών, XLOGP3, μια τροποποιημένη μέθοδο βασιζόμενη στο σύστημα θραυσμάτων των Wildman and Crippen, WLOGP⁴⁰, τη μέθοδο του Moriguchi MLOGP⁴¹, που βασίζεται σε εξίσωση-μοντέλο με 13 μοριακές παραμέτρους MLOGP, μια υβριδική μέθοδο που βασίζεται σε 27 θραυματα και 5 τοπολογικές παραμέτρους, SILICOS-IT (<http://silicos-it.be.s3-website-eu-west-1.amazonaws.com/software/filter-it/1.0.2/filter-it.html>), και μια in-house μέθοδο, βασιζόμενη στην ελεύθερη ενέργεια

διάλυσης (Free Energy of Solvation) στο σύστημα οκτανόλης-νερού υπολογισμένη με το συνεχές μοντέλο GB/SA⁴², το οποίο χρησιμοποιεί τη γενικευμένη εξίσωση Born και το εμβαδόν επιφανείας προσιτής στο διαλύτη (solvent accessible surface area, SASA), iLOGP.

Το λογισμικό pkCSM χρησιμοποιεί για την πρόβλεψη ιδιοτήτων ADMET το μοριακό αποτύπωμα με βάση τα δομικά γραφήματα. (Graph-Based Signatures)³⁸. Η θεωρία των γράφων έχει χρησιμοποιηθεί για την αναπαράσταση των μορίων και την εξαγωγή μεταβλητών που περιγράφουν διάφορες μοριακές ιδιότητες⁴³. Το λογισμικό pkCSM προβλέπει ιδιότητες που περιλαμβάνουν i) το τοξικοφόρο αποτύπωμα (toxicophore fingerprint) ii) τη συχνότητα του ατομικού φαρμακοφόρου (Atomic pharmacophore frequency count) και iii) και τις μοριακές ιδιότητες όπως τη λιποφιλία (logP), το μοριακό βάρος, το εμβαδόν επιφανείας, τους περιστρεφόμενους δεσμούς κλπ. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη του προφίλ των μοριακών ιδιοτήτων φαρμακο-ομοιότητας, των ιδιοτήτων ADME καθώς και και δεικτών τοξικότητας και οικοτοξικότητας.

Το λογισμικό preADMET παρέχει βαθμολόγηση ως προς τους κανόνες φαρμακο-ομοιότητας εκτίμηση ιδιοτήτων ADME και ορισμένων δεικτών τοξικότητας και οικοτοξικότητας.

Οι ενώσεις εισήχθησαν στα λογισμικά SwissADME και pkCSM με τη χρήση συστήματος μοριακής γραμμικής γραφής SMILES (simplified molecular-input line-entry system) και στο preADMET σχεδιαστικά. Επεξηγήσεις για την καταχώρηση των αποτελεσμάτων από τα προγράμματα αναφέρονται στους **πίνακες 1 και 2**. Για ορισμένες ιδιότητες τα αποτελέσματα είναι αριθμητικά, ενώ σε άλλες περιπτώσεις υπάρχει θετική ή αρνητική κατηγοριοποίηση. Κατά την επιμέλεια των αποτελεσμάτων από τα διαφορετικά λογισμικά έγινε εναρμόνιση ως προς τις μονάδες (όπου υπήρχαν), ώστε η σύγκριση να είναι ευκολότερη.

Αποτελέσματα-Συζήτηση

Οι προπαργυλαμίνες αποτελούν μια ετερογενή οικογένεια οργανικών ενώσεων με μοναδικές ιδιότητες

Πίνακας 1. Επεξηγήσεις για την καταχώρηση των αποτελεσμάτων φαρμακο-ομοιότητας και ιδιοτήτων ADME

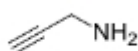
Καταχώρηση	Ιδιότητα	Πληροφορίες -Μονάδες	Ιδιότητα ADME
Mw	Μοριακό Βάρος	Μέτρο μεγέθους	Φαρμακο-ομοιότητα
logP	λιποφιλία	Υπολογισμός με διάφορα προγράμματα	Φαρμακο-ομοιότητα
RB	Rotatable bonds Περιστρεφόμενοι δεσμοί	Μέτρο ευκαμψίας	Φαρμακο-ομοιότητα
HD	Δέκτες σε υδρογονικούς δεσμούς	Άτομα H συνδεδεμένα με N ή O	Φαρμακο-ομοιότητα
HA	Δότες σε υδρογονικούς δεσμούς	Άτομα N + O	Φαρμακο-ομοιότητα
tPSA	Τοπολογική Πολική Επιφάνεια	Μέτρο πολικότητας	Φαρμακο-ομοιότητα
SA	Surface Area, Εμβαδό επιφάνειας	Μέτρο του μεγέθους	Φαρμακο-ομοιότητα
logS	Μοριακή διαλυτότητα στο νερό		Φαρμακο-ομοιότητα
Ro5	Κανόνας του πέντε-Lipinski	Ναι - 0 παραβιάσεις Όχι	Φαρμακο-ομοιότητα
Veber	Κανόνας Veber	Ναι/Όχι	Φαρμακο-ομοιότητα
CMC rule /Ghose	CMC-like rule /κανόνας του Ghose	Παραβιάσεις Ναι/Όχι	Φαρμακο-ομοιότητα
HIA	Human Intestinal Absorption Γαστρεντερική Απορρόφηση	in vivo, %	Απορρόφηση
BBB	Διαπερατότητα ΑΕΦ	logBB	Κατανομή
P450	υπόστρωμα/αναστολέας σε ισοένζυμα του P450	Ναι/Όχι	Μεταβολισμός
P-gp	υπόστρωμα/αναστολέας της p-γλυκοπρωτεΐνης	Ναι/Όχι	Απορρόφηση
Caco-2	Διαπερατότητα σε κυτταρικές σειρές Caco2	logPapp/cm10-6/sec	Απορρόφηση
PPB	Πρωτεϊνική σύνδεση	%PPB ή μη συνδεδεμένο κλάσμα, fu	Κατανομή

Πίνακας 2. Επεξηγήσεις για την καταχώρηση των αποτελεσμάτων τοξικότητας

Καταχώρηση	Ιδιότητα	Μονάδες
AMES	Δοκιμή για μεταλλαξιογόνο δράση	ναι/ό
Oral rat acute toxicity ⁴⁶	Οξεία Τοξικότητα σε αρουραίους	LD50 mol/kg
Oral rat chronic toxicity ⁴⁷	Χρόνια Τοξικότητα σε αρουραίους	LOAEL-Lowest Observed Adverse Effect Level log mg/kg_bw/day
Hepatotoxicity	Επαγόμενη Ηπατοτοξικότητα	ναι/οχι
HerG Inhibition	Αναστολή διαύλων καλίου Herg	ναι/όχι
Skin sensitivity	Ευαισθησία στο δέρμα	ναι/όχι
T.Pyriformis	(Οικο)τοξικότητα σε Tetrahymenis Pyriformis	log (μg/L)
Τοξικότητα Minnow	(Οικο)τοξικότητα σε Fathead Minnow	log (mM)

που έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας. Η προπαργυλαμίνη είναι αναστολέας της μονοαμινοξειδάσης B, η οποία θεωρείται ότι εμπλέκεται στην φυσιοπαθολογία της νόσου ⁴⁴. Σε ασθενείς με Alzheimer παρατηρείται αυξημένη δραστηριότητα της MAO-B και η αναστολή της ενδέχεται να διατηρεί τα εναπομείναντα επίπεδα κατεχολαμινών προστατεύοντας από περαιτέρω απώλεια νευρώνων ⁴⁵.

Στο μόριο όλων των υπό μελέτη ενώσεων διατηρείται η ομάδα της προπαργυλαμίνης, ως κοινό



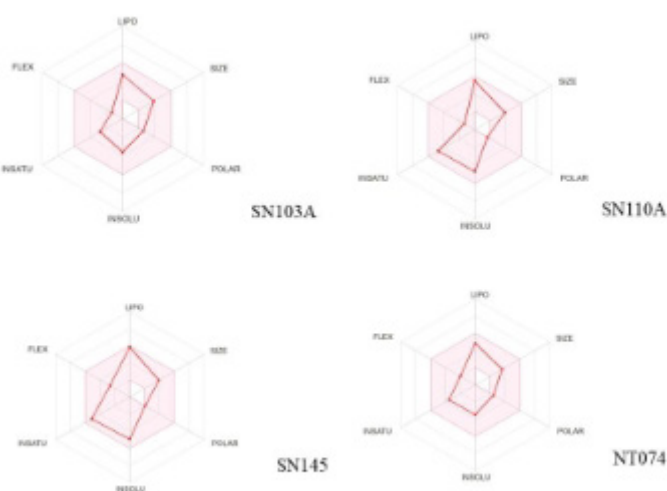
δομικό στοιχείο, με το άζωτο να είναι είτε συστατικό πυρρολιδίνης (ενώσεις SN103A και SN110A) ή της δευτεροταγούς αμίνης (ενώσεις SN145 και NT074). (Σχήμα 3). Άλλες τροποποιήσεις στη δομή αφορούν στην παρουσία πυριδίνης (SN103A και SN110A) ή π- υποκατεστημένου φαινυλίου (SN145 και NT074) σε σύνδεση με την πυρρολιδίνη ή την δευτεροταγή αμίνη αντίστοιχα, ή παρουσία κυκλοεξανίου (SN103A, SN145 και NT074) ή κυκλοπεντανίου (SN110A) και η παρουσία λειτουργικής ομάδας της αλκοόλης (SN103A και NT074) ή φαινυλίου στο άκρο της προπαργυλαμίνης. (Σχήμα 3).

Τα λογισμικά ελεύθερης πρόσβασης που χρησιμοποιήθηκαν είναι εύχρηστα και φιλικά στον χρήστη. Το λογισμικό SwissADME παρέχει περισσότερο αναλυτικές πληροφορίες για την φαρμακο-ομοιότητα και τις ιδιότητες ADME, ενώ τα pkCSM και PrteADME προβλέπουν επίσης δείκτες τοξικότητας και οικοτοξικότητας (Πίνακες 1 και 2).

Στο Σχήμα 4 παρουσιάζονται τα διαγράμματα φαρμακο-ομοιότητας σύμφωνα με το λογισμικό SwissADME. Οι ιδιότητες που περιλαμβάνει το διάγραμμα είναι η λιποφιλία (LIPO), το μέγεθος (size), η πολωσιμότητα (POLAR), η δυσδιαλυτότητα (INSOLU), ο αρωματικός χαρακτήρας (INSATU) και η ευκαμψία (FLEX) των μορίων. Η χρωματισμένη ζώνη δείχνει τις φυσικοχημικές ιδιότητες που είναι ευνοϊκές για από του στόματος απορρόφηση.

Και οι τέσσερις ενώσεις βρίσκονται εντός της χρωματισμένης περιοχής.

Στους Πίνακες 3 και 4 συγκεντρώνονται τα αποτελέσματα τα οποία αναφέρονται στη φαρμακο-ομοιότητα



Σχήμα 4. Διάγραμμα φαρμακο-ομοιότητας σύμφωνα με το λογισμικό SwissADME.

και τις ιδιότητες ADME των ενώσεων με την εφαρμογή των τριών λογισμικών. Με έντονη γραφή επισημαίνονται διαφοροποιήσεις μεταξύ των λογισμικών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πινάκων 3 και 4 όλες οι ενώσεις πληρούν τις προϋποθέσεις φαρμακο-ομοιότητας, καθώς και τα αυστηρότερα κριτήρια για την είσοδο στο ΚΝΣ, με μοριακό βάρος <400, N+O <5 και tPSA < 60Å. Επι πλέον σε κάθε περίπτωση η διαφορά logP-(N+O) είναι >0. Η περαιτέρω καταγραφή των ιδιοτήτων ADME δείχνει υψηλή γαστρεντερική απορρόφηση, η οποία στην περίπτωση του λογισμικού pkCSM συμφωνεί με επαρκή διαπερατότητα Caco-2 (< 10 cmx10⁻⁶/sec). Το λογισμικό PreADMET ωστόσο υπολογίζει για όλες τις ενώσεις διαπερατότητα Caco-2 μια τάξη μεγέθους μικρότερη. Σύμφωνα με το λογισμικό SwissADME οι ενώσεις αποτελούν υπόστρωμα της p-γλυκοπρωτεΐνης εκτός από την ένωση NT074. Διαφοροποιημένα είναι τα αποτελέσματα με το λογισμικό pkCSM. Το λογισμικό preADMET προβλέπει αρκετά ισχυρή πρωτεϊνική σύνδεση, η οποία για την ένωση NT074 είναι 100%, ωστόσο, σύμφωνα με το pkCSM σε κάθε περίπτωση υπάρχει μη συνδεδεμένο κλάσμα, σημαντική πληροφορία για την αποτελεσματικότητα, δεδομένου ότι η μη συνδεδεμένη μορφή

Πίνακας 3. Αποτελέσματα για την φαρμακο-ομοιότητα και τις ιδιότητες ADME των ενώσεων SN103A και SN110A με τη χρήση των λογισμικών SwissADME (I) pKCSm (II) και preADMET (III).

	SN103A			SN110A		
Ιδιότητα	I	II	III	I	II	III
Mw	312,45	312,46		316,44	316,44	
logP	3,31	3,696	3,21	3,68	4,58	5,33
RB	2	2		2	2	
HA	3	3		2	2	
HD	1	1		0	0	
tPSA	36,36			16,13		
SA		139,667			144,47	
logS	-3,20 – -4,21*	-3,177	-4,90	-4,21- -6,20**	-4,26	-3,91
Ro5	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
Veber	Ναι					
CMC rule	Ναι		Ναι	Ναι		Ναι
HIA	Υψηλή	94,2	95,99	Υψηλή	95,4	100
BBB	Ναι	0,352	0,469	Ναι	0,494	0,610
P450 Αναστολή	CYP2D6	CYP2D6	CYP3A4 CYP2D6	CYP2D6	CYP2D6, CYP1A2, CYP2C19	CYP2D6, CYP3A4
P-gp- Sub.	ναι	όχι		ναι		
P-gp- Inh			ναι		ναι-PgPII	ναι
Caco-2***		1,573/ 37,4	0,462/ 2,889		1,822/ 66,37	0,368/ 2,335
PPB		0,42 (fu)	95,99 (%)		0,112	89,35

*διαλυτή έως μετρίως διαλυτή ** μετρίως διαλυτή έως ασθενώς διαλυτή

*** $\log P_{app}/cm10^{-6}/sec$

συνδέεται με τον υποδοχέα. Είναι αναστολείς κυρίως του ισοενζύμου CYP2D6.

Στον Πίνακα 5 συγκεντρώνονται τα αποτελέσματα για την τοξικότητα/οικοτοξικότητα. Έχουν διατηρηθεί οι μονάδες του λογισμικού pKCSm και έχουν μετατραπεί αναλόγως οι μονάδες του λογισμικού preADMET, ώστε να είναι ευκολότερη η σύγκριση

Παρατηρείται διαφοροποίηση των δύο λογισμι-

κών ως προς τη δοκιμή AMES με το pKCSm να δίνει αρνητικό αποτέλεσμα και το preADMET θετικό, υποδηλώνοντας μεταλλαξιογόνο δράση. Το λογισμικό preADMET παρέχει περαιτέρω πληροφορίες για 4 επι μέρους στελέχη της *Salmonella* που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή AMES (δεν αναφέρονται στον Πίνακα 5). Προκύπτει ότι η δοκιμή προβλέπεται θετική σε ένα μόνο στέλεχος (TA1535_10RLI) για τα παράγωγα SN103A και SN110A, τα οποία φέρουν

Πίνακας 4. Αποτελέσματα για την φαρμακο-ομοιότητα και τις ιδιότητες ADME των ενώσεων SN145 και NT074 με τη χρήση των λογισμικών SwissADME (I) pKCSm (II) και preADMET (III).

	SN145			NT074		
	I	II	III	I	II	III
Mw	319,44	319,448		289,394		
logP	4,55	4,54	5,56	4,55	3,39	3,46
RB	4	4		3	3	
HA	2	2		2	2	
HD	1	1		2	2	
tPSA	21,26			32,26		
SA		144,795			126,314	
logS	-4,932-7,22*	-3,85	-4,97	-3,51-5,11**	-2,90	-3,25
Ro5	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι
Veber	ναι	ναι		ναι	ναι	
CMC rule		ναι	ναι	ναι	ναι	
HIA	Υψηλή	90,6	99,49	Υψηλή	92,2	93,2
BBB	ναι	0,575	1,03	ναι	0,292	0,842
P450 Αναστολή	CYP1A2 CYP2D6	CYP3A4 CYP2D6 CYP2C19 CYP1A2	CYP2D6	CYP2D6	CYP2D6 CYP3A4	CYP2D6
P-gp- Sub	ναι	ναι		όχι	ναι	
P-gp- Inh		ναι -P-gp I και P-gp II	ναι			ναι
Caco-2***		1,504 31,91	0,751/ 56,48	0,684/ 4,835	1,226/ 16,826	
PPB		0,112	88,97	0,318	100,0	

* μετρίως διαλυτή έως ασθενώς διαλυτή ** διαλυτή έως μετρίως διαλυτή

*** $\log P_{app} / \text{cm}10^{-6}/\text{sec}$

πυρολιδίνη, ενώ για τα παράγωγα SN145 και NT074 το αποτέλεσμα είναι αρνητικό και για τα 4 στελέχη.

Σύμφωνα και με τα δυο λογισμικά οι ενώσεις προβλέπονται ηπατοτοξικές, μία σοβαρή ανεπιθύμητη ενέργεια που πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω. Δεν προκαλούν ερεθισμούς στο δέρμα. Δεν είναι τοξικές ως προς την *Tetrahymena Pyriformis* με τιμές

$\log \text{IGC50}$ κατά πολύ μεγαλύτερης του ορίου 0.2 ($\mu\text{g/L}$), ενώ Minnow τοξικότητα εμφανίζουν οι ενώσεις SN110 και SN145 με τιμή LC50 μικρότερες του κατώτερου ορίου 0,5 mM.

3. Συμπεράσματα

Πίνακας 5. Αποτελέσματα για την τοξικότητα με χρήση των λογισμικών pKCSm (II) και preADMET (III)

	SN103A		SN110A		SN145		NT074	
	II	III	II	III	II	III	II	III
AMES	Όχι	Ναι	Όχι	Ναι	Όχι	Ναι	Όχι	Ναι
Oral rat acute toxicity								
2,737		2,216		3,104		2,697		
Oral rat chronic toxicity	1,426		0,505		0,938		1,666	
Hepatotoxicity	ναι		ναι		ναι		ναι	
HerG Inhibition	όχι	Μέτρια επικινδυνότητα	ναι Herg II	Μέτρια επικινδυνότητα		Μέτρια επικινδυνότητα		Μέτρια επικινδυνότητα
Skin sensitivity	όχι		όχι	όχι	όχι		όχι	
T.Pyriformis	0,777		1,946		0,621		1,257	
Τοξικότητα Minnow	1,075	0,948	-1,534	0,272*	-0,672	-0,159	1,657	0,610

Σύμφωνα και με τα τρία λογισμικά οι υπό μελέτη ενώσεις βρίσκονται εντός των πλαισίων φαρμακο-ομοιότητας ως προς τη χορήγηση από του στόματος, παρουσιάζουν υψηλή γαστρεντερική απορρόφηση, διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και φαίνεται να παρουσιάζουν γενικά ικανοποιητικό φαρμακοκινητικό προφίλ, εμφανίζουν ωστόσο ηπατοτοξικότητα, ενώ τα αποτελέσματα διαφοροποιούνται ως προς τη δοκιμή Ames για με-

ταλλαξιγόνο δράση.

Τα προκαταρκτικά αυτά αποτελέσματα μορφοποιούν το προφίλ των υπό μελέτη ενέσεων, αποτελούν χρήσιμες πληροφορίες για την περαιτέρω έρευνα παραγώγων προπαργυλαμίνης με πιθανή νευροπροστατευτική δράση στη νόσο Alzheimer και καταδεικνύουν τη χρησιμότητα των ελεύθερης πρόσβασης λογισμικών στο σχεδιασμό νέων φαρμακομορίων. □

***In silico* Prognostic Methods for Physicochemical Properties and Toxicity of Propargylamine Derivatives, Inhibitors of Monoaminoxidase**

Panagiou Mavroeidi¹, Nikitas Georgiou¹, Afroditi Vogiatzaki¹, Anastasia Maria Kouvari¹, Eleni Siskou¹, George Apostolopoulos¹, Nikolaos V. Tzouras¹, Stavros P. Neofotistos¹, George Vougioukalakis¹, A. Tsantili-Kakoulidou^{1*}, Thomas Mavromoustakos^{1*}

¹*National and Kapodistrian University of Athens, Chemistry Department, Laboratory of Organic Chemistry, Panepistimiopolis, 15784, Athens, Greece*

KEYWORDS:

SwissADME,
pkCSM, preADMET,
Pharmacokinetics,
druglikeness, Rule of 5

CORRESPONDING AUTHORS:

Th. Mavromoustakos,
e-mail: tmavrom@chem.uoa.gr
A. Tsantili-Kakoulidou,
e-mail: tsantili@pharm.uoa.gr

ABSTRACT

Drug molecules meet major obstacles in their attempt to aim the target organ and achieve the desired biological action. Pharmacokinetic issues affect drug efficacy, which together with drug safety are the principal reasons for the high attrition rate. To face these problems in the early stages of drug discovery open access software have been developed, which serve as a powerful tool in the quiver of medicinal chemists since they provide information on drug-likeness and enable predictions of ADME and pharmacokinetic properties, as well as of essential toxicity indices. In the present article three open access software, SwissADME, pkCSm and preADMET, have been applied in the case of four propargylamine derivatives synthesized as potential neuroprotective agents in Alzheimer disease. Predictions have shown compliance with drug-like criteria, satisfactory ADME and satisfactory pharmacokinetic profile. However they are considered to be hepatotoxic, while there is mutagenicity alert according to preADMET, despite negative response to three out of four or to all four individual strains.

References

1. Lambrinidis G., Tsantili-Kakoulidou A. Challenges with multi-objective QSAR in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 13(9), 851-859, 2018
2. Kola, I., & Landis, J.). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 711-715, 2004.
3. Lambrinidis G., Tsopelas F., Giaginis C., Tsantili-Kakoulidou A. (2017) in: *Advances in QSAR Modeling, Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics QSAR/QSPR Modeling in the Design of Drug Candidates with Balanced Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties* Springer 24, International Publishing AG 2017 K. Roy (ed.), pp.339-384. Doi: 10.1007/978-3-319-56850-8_9
4. Ginex, T., Vazquez, J., Gilbert, E., Herrero, E., Luque, F. J. Lipophilicity in Drug Design: An Overview of Lipophilicity Descriptors in 3D-QSAR Studies. *Future Med. Chem.* 11 (10), 1177-1193, 2019. doi.org/10.4155/fmc-2018-0435.
5. Mannhold R., Poda G.I., Ostermann C., Tetko I.V. Calculation of molecular lipophilicity: State-of-the-art and comparison of log P methods on more than 96,000 compounds. *J. Pharm. Sci.* 98(3), 861-93, 2009
6. Editorial, A decade of drug-likeness. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 853, 2007.
7. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. In Vitro Models for Selection of Development Candidates Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23, 3-25, 1997.
8. Veber D. F., Johnson S. R., Cheng H.-Y., Smith B. R., Ward K. W., Kopple K. D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* 45 (12), 2615-2623, 2002. https://doi.org/10.1021/jm020017n.
9. Ghose A. K., Viswanadhan V. N., Wendoloski J. J. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. *J. Comb. Chem.* 1 (1), 55-68, 1999. https://doi.org/10.1021/cc9800071.
10. Ghose A. K., Crippen G. M. Atomic Physicochemical Parameters for Three-Dimensional Structure Directed Quantitative Structure-Activity Relationships I. Partition Coefficients as a Measure of Hydrophobicity. *J. Comput. Chem.* 7, 565-577, 1986.
11. Le Fèvre R. J. W. Molecular Refractivity and Polarizability (1965). pp 1-90. https://doi.org/10.1016/S0065-3160(08)60298-1.
12. Larregieu C. A., Benet L. Z. Distinguishing between the permeability relationships with absorption and metabolism to improve BCS and BDDCS predictions in early drug discovery. *Mol. Pharm.*, 11, 1335-1344, 2014.
13. Kobayashi, M.; Sada, N.; Sugawara, M.; Iseki, K.; Miyazaki, K. Development of a New System for Prediction of Drug Absorption That Takes into Account Drug Dissolution and PH Change in the Gastro-Intestinal Tract. *Int. J. Pharm.* 221 (1-2), 87-94, 2001. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00663-9.
14. Larregieu, C. A., & Benet, L. Z. Drug discovery and regulatory considerations for improving in silico and in vitro predictions that use Caco-2 as a surrogate for human intestinal permeability measurements. *AAPS J.* 15, 483-497, 2013.
15. Daneman, R.; Prat, A. The Blood-Brain Barrier. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7 (1), 2015, a020412. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412.
16. Pajouhesh H, Lenz GR. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRx*. 2005 Oct;2(4):541-53. doi: 10.1602/neurorx.2.4.541. PMID: 16489364; PMCID: PMC1201314.
17. Abraham M. H., Ibrahim A., Zhao Y., Acree W. E. A data base for partition of volatile organic compounds and drugs from blood/plasma/se-

- rum to brain, and an LFER analysis of the data. *J.Pharm. Sci.* 95, 2091–2100, 2006.
18. McDonnell A. M., Dang C. H. Basic Review of the Cytochrome P450 System. *J. Adv. Pract. Oncol.* 4 (4), 263–268, 2013 . <https://doi.org/10.6004/jadpro.2013.4.4.7>.
 19. Testa B. Drug metabolism for the perplexed medicinal chemist. *Chem.Biodivers.* 6, 2055–2070, 2009
 20. Lin J.H. How significant is the role of P-glycoprotein in drug absorption and brain uptake? *Drugs Today (Barc).* 40(1),5-22,2004. doi: 10.1358/dot.2004.40.1.799434.
 21. Schinkel A.H. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36(2-3),179-194,1999. doi: 10.1016/s0169-409x(98)00085-4.
 22. Finch A., Pillans P. P-glycoprotein and its role in drug-drug interactions *Aust.Prescr.* 37,137-9,2014
 23. Vijay U, Gupta S, Mathur P, Suravajhala P, Bhatnagar P. Microbial Mutagenicity Assay: Ames Test. *Bio Protoc.* 8(6):e2763, 2018. doi:10.21769/BioProtoc.2763
 24. Garrido A., Lepailleur A., Mignani S. M., Dallemagne P., Rochais C. HERG Toxicity Assessment: Useful Guidelines for Drug Design. *Eur. J. Med. Chem.* 195, 112290, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112290>.
 25. Björnsson E.S. Hepatotoxicity by Drugs: The Most Common Implicated Agents. *Int. J. Mol. Sci.* 17(2), 224, 2016. doi:10.3390/ijms17020224.
 26. Fourches D., Barnes J.C., Day N.C., Bradley P., Reed J.Z., Tropsha A. Cheminformatics analysis of assertions mined from literature that describe drug-induced liver injury in different species. *Chem. Res. Toxicol.* 23(1),171-183, 2010. doi:10.1021/tx900326k
 27. Ta G.H., Weng C.-F. Leong M.K. (2021 In silico Prediction of Skin Sensitization: Quo vadis? *Front. Pharmacol.* 12,655771, 2021doi: 10.3389/fphar.2021.655771
 28. Alves, V. M., Muratov, E., Fourches, D., Strickland, J., Kleinstreuer, N., Andrade, C. H., & Tropsha, A. (2015). Predicting chemically-induced skin reactions. Part I: QSAR models of skin sensitization and their application to identify potentially hazardous compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 284(2), 262–272. <https://doi.org/10.101/j.taap.2014.12.014>
 29. Wilma A., Kuhn J., Kirchmair J. Computational approaches for skin sensitization prediction. *Crit. Rev. Toxicol.* 48 (9), 738–760,2018
 30. European Medicines Agency Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use; European Medicines Agency: London, UK, 2006. Available at https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-environmental-risk-assessment-medicinal-products-human-use-first-version_en.pdf (accessed at 13-05-2023).
 31. Buckler, D.R., Mayer, F.L., Ellersieck, M.R. and Asfaw A. Acute Toxicity Value Extrapolation with Fish and Aquatic Invertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49, 546-48, 2005.
 32. Cheng, F.; Shen, J.; Yu, Y.; Li, W.; Liu, G.; Lee, P. W.; Tang, Y. In Silico Prediction of Tetrahymena Pyriformis Toxicity for Diverse Industrial Chemicals with Substructure Pattern Recognition and Machine Learning Methods. *Chemosphere*, 82 (11), 1636–1643, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.11.043>.
 33. Wu, X.; Zhang, Q.; Hu, J. QSAR Study of the Acute Toxicity to Fathead Minnow Based on a Large Dataset. *SAR QSAR Environ. Res.* 27 (2), 147–164, 2016. <https://doi.org/10.1080/1062936X.2015.1137353>.
 34. Tsopelas F, Tsantili-Kakoulidou A. (2022) in: Chemometrics and Cheminformatics in Aquatic Toxicology Chapter 11. The QSAR Paradigm to Explore and Predict Aquatic Toxicity (Ed) Kunal Roy, John Wiley & Sons, Inc. pp.201-225 .doi:10.1002/9781119681397
 35. Tzouras, N. V.; Neofotistos, S. P.; Vougioukalakis, G. C. Zn-Catalyzed Multicomponent KA 2 Coupling: One-Pot Assembly of Propargylamines Bearing Tetrasubstituted Carbon Centers. *ACS Omega*, 4 (6), 10279–10292, 2019. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01387>.

36. Neofotistos, S. P.; Tzouras, N. V.; Pauze, M.; Gómez-Bengoa, E.; Vougioukalakis, G. C. Manganese-Catalyzed Multicomponent Synthesis of Tetrasubstituted Propargylamines: System Development and Theoretical Study. *Adv. Synth. Catal.* 362 (18), 3872–3885, 2020. <https://doi.org/10.1002/adsc.202000566>.
37. Daina A., Olivier Michielin O. Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* 7, 42717, 2017. doi: 10.1038/srep4271
38. Pires DE, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *J. Med. Chem.* 14;58(9):4066-72, 2015. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00104.
39. Lee S.K., Chang G.S., Lee, I.H., Chung J.E., Sung K.Y., No K.T.. PreADME : PC-BASED PROGRAM FOR BATCH PREDICTION OF ADME PROPERTIES EuroQSAR 2004, 5-10,9,2004, Istanbul, Turkey
40. Wildman S. A. , Crippen G. M. Prediction of Physicochemical Parameters by Atomic Contributions. *J. Chem. Inf. Model.* 39, 868–873, 1999.
41. Moriguchi I., Hirono S., Liu Q., Nakagome I., Matsushita Y. Simple Method of Calculating Octanol/Water Partition Coefficient. *Chem. Pharm. Bull.* 40 (1), 127–130, 1992. <https://doi.org/10.1248/cpb.40.127>.
42. Best S.A, Merz K.M., Reynolds C.H. GB/SA-Based Continuum Solvation Model for Octanol. *J. Phys. Chem. B*, 101, 49, 10479–10487, 1997
43. David L, Thakkar A, Mercado R, Engkvist O. Molecular representations in AI-driven drug discovery: a review and practical guide. *J. Cheminform.* 12(1), 56, 2020.
44. Marco-Contelles J, Unzeta M, Bolea I, et al. ASS234, As a New Multi-Target Directed Propargylamine for Alzheimer's Disease Therapy. *Front Neurosci.* 10, 294, 2016. doi:10.3389/fnins.2016.00294
45. Mandel S., Weinreb O., Amit T, Youdim M. B. H. Mechanism of neuroprotective action of the anti-Parkinson drug rasagiline and its derivatives. *Brain Res. Rev.* 48, 379–387, 2005.
46. Walum E. Acute Oral Toxicity. *Environ. Health Perspect.* 106 (suppl 2), 497–503, 1998.
47. Mazzatorta P, Estevez M. D., Coulet M., Schilter B. Modeling Oral Rat Chronic Toxicity. *J. Chem. Inf. Model.* 48 (10), 1949–1954, 2008.

Formulation and In-vitro Evaluation of the Ophthalmic Hydrogel Containing Cromolyn Sodium

Fahimeh Sakhaie^{1*}, Seyed Alireza Mortazavi¹, Fatemeh Ghorbani-Bidkorbeh¹, Zahra Hashemi²

¹Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²Department of Toxicology and Pharmacology, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

KEYWORDS:

Ocular hydrogel,
Formulation, Carbopol
934, Cromolyn Sodium,
HPMC.

ARTICLE INFO:

Received: September 11, 2021

Revised: February 25, 2022

Accepted: March 15, 2022

Published on line: July, 19, 2022

* CORRESPONDING

AUTHORS:

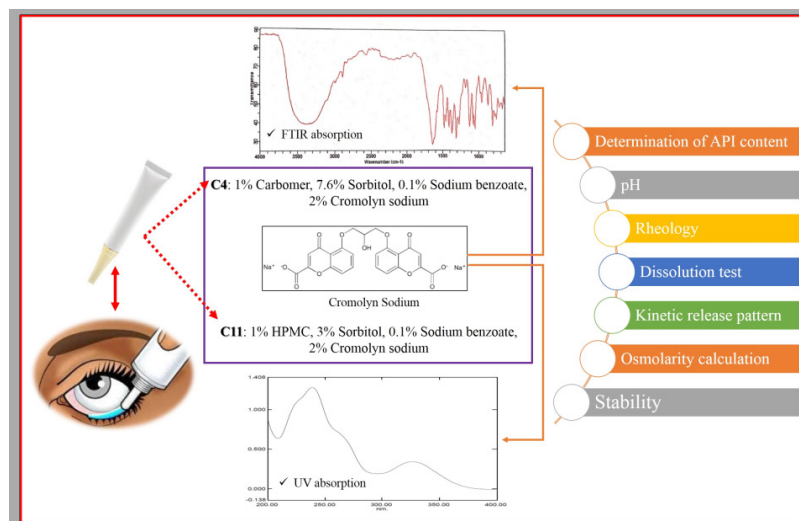
Fahimeh Sakhaie e-mail:
fsakhaie1370@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Hydrogel-based ocular drug delivery systems are modern routes of drug delivery systems that are used to increase the durability of drugs. Carbopol 934 and Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) were selected and hydrogel formulations were made using concentrations of 0.4% to 1.5% carbomer 934 and 0.7% to 1.5% HPMC and 2% sodium cromolyn. **Methods:** In this study, synthetic formulations were investigated about physical appearance, pH and rheology. By increasing polymer, the viscosity increased too. Adding the API, preservatives and sorbitol to the gel containing polymer resulted in decreased viscosity. The optimized formulations were chosen with ingredients of Carbomer 1%, Sorbitol 7.6% and HPMC 1%, Sorbitol 3%. The two selected samples of C4 (1% Carbomer, 7.6% Sorbitol, 0.1% Sodium Benzoate, 2% Cromolyn Sodium) and C11 (1% HPMC, 3% Sorbitol, 0.1% Sodium Benzoate, 2% Cromolyn Sodium) were evaluated of supplemental tests such as dissolution, isotonicity, short term stability, API content assay and sterility.

Results: The reports of content assay and viscosity were acceptable based on Cromolyn sodium eye drop monograph and in comparison, with the market sample, respectively. In addition, the pH and osmolarity of mentioned formulations were also acceptable as an eye dosage form. Both synthetic samples follow non-thixotropic and pseudoplastic behavior. As the total drug content of formulations were released during 6 hours with diffusion mechanism and also with while considerable stability in the short-term test, indication that the interval application of hydrogel can be decreased shortened.

Conclusion: Based on this study, the ocular hydrogel formulation of Cromolyn Sodium can be considered as a novel therapeutic agent in ophthalmologic drug delivery.



1. Introduction

Ophthalmic drug delivery faces major complications in pharmaceutical science. Eye drug delivery is limited due to numerous constraints. For instance, the presence of several layers of permeation barriers in ocular surface tissue, from the tear film to the inner layers of the cornea which is considered a remarkable barrier to drug absorption¹. What's more, the relative permeability of the cornea decreases the penetration of applied drugs². The conjunctiva and the underlying sclera have a greater surface area than the cornea that results in conduits to systemic absorption. The removal mechanism (tear fluid turnover, blinking), the nasolacrimal drainage and the blood-ocular barriers play role in decreasing the local bioavailability of drugs and residence time on the ocular surface in the topical application³. Due to the mentioned barriers, only 5% of the drug is absorbed into the cornea which leads to a high frequency of drug application, increase in systemic side effects and low rate of patient's compliance⁴.

The topical delivery of ophthalmic drugs consists of convenient methods such as eye drops and eye ointments and novel ones including microparticles, liposomes, nanoparticles.

Conventional dosage form of drug delivery is

known as a convenient method to deliver water-soluble therapeutic agents as an aqueous solution and water-insoluble drugs as an ointment or aqueous suspensions⁵. There are some advantages such as convenient use, noninvasive, cost-efficient and ease of manufacturing are discussed about conventional dosage form. On the other hand, disadvantages of conventional dosage form including a short time of contact, poor ocular bioavailability, low compliance and low optimal drug concentration⁶.

Eye drop of formulation has the most excellent acceptance by patients due to its simplicity of administration. It accounts for approximately 90% of all ophthalmic formulations⁷. On the other hand, a number of drawbacks are also observed. 95% of the drugs are eliminated with the lachrymal apparatus and the different barriers in 15 to 30 seconds after the installation. Moreover, a secondary eye infection can be caused by microbiological contamination with multidose packaging^{3,7}.

Ointments with lipophilic and water-soluble bases show different times of remaining on skin or mucus, it also differs inconvenience about washing with water^{3,7}. They are well tolerated, fairly safe, and provide an excellent means to enhance ocular contact time⁸. They also can slow down the elimination of the drug by the tears flow and increasing

the corneal residence time by prolonging surface time residence. Blurred vision and time limitation of administration in the evenings are disadvantages about this dosage form besides the low patient acceptability^{3,7}.

Hydrogels are an extremely versatile class of materials with many potential applications in ophthalmology. They found widespread application as soft contact lenses, foldable intraocular lenses, in situ gelling formulations for ophthalmic drug delivery and ocular adhesives for wound repair; their use as vitreous substitutes and intravitreal drug delivery systems is currently under investigation⁹. They are the main constituent in contact lenses due to their high-water content and favorable properties that provide them highly compatibility with human tissues⁶.

Hydrogels may offer several advantages. For example, the mild preparation conditions and high-water content of hydrogels are beneficial in preserving the activity of biopharmaceuticals such as peptides, proteins or nucleic acids.

Although hydrogels have many possible applications in ophthalmology, comparatively few products have been brought on the market. While hydrogel-based Soft Contact Lens (SCL) and foldable Intraocular Lenses (IOL) have proven to be extremely successful, the clinical use of hydrogel-based vitreous substitutes or intravitreal drug delivery systems is still not feasible. The reasons for this are manifold: first of all, hydrogels are notoriously difficult to sterilize.

The most natural and synthetic polymers are degraded during heat sterilization; radiation or chemical sterilization may induce side reactions that affect the gel properties. These problems are exacerbated when proteins or other biopharmaceuticals are incorporated. In addition, the shelf life of preformed hydrogels is generally limited; likewise, the reactivity of in situ cross-linkable polymers may decrease during storage. Further limitations arise from the type and quantity of drugs that can be incorporated into hydrogels.

While hydrophilic low-molecular-weight drugs are easily loaded into hydrogels by partitioning from concentrated drug solutions, this process is ineffective in the case of hydrophobic drugs (e.g., corticos-

teroids) or macromolecular drugs (e.g., proteins or nucleic acids). Hydrophobic drugs are poorly soluble in the gel matrix; thus, drug loading can be improved by introducing hydrophobic domains or cyclodextrins. In contrast to that, the uptake of macromolecular drugs is typically limited by restricted diffusion. This can be addressed by in situ encapsulation of macromolecular drugs; however, cross-linking of hydrogels in the presence of biopharmaceuticals is still a formidable challenge¹⁰.

However, gel-like formulations have disadvantages. They can spread on the corneal surface and cause blurred vision. The deposits that form around the eyelids after instillation and their stickiness are considered uncomfortable for the patient. Moreover, it is difficult to administer an accurate dose of jellified product due to variations in the amount of drug delivered when administered topically¹¹.

Polymer is used in liquid ophthalmic vehicles due to its numerous advantages:

- Increasing ocular contact time by adhering to the mucous layer of the tear film
 - High drug bioavailability
- (These are ascribed to the increased viscosity induced by the presence of the macromolecules)¹².
- Simulating the continuous delivery of tears due to high water retaining capacity
 - Decreasing instillation frequency results in increased patient's compliance¹².

What makes the polymer effective in eye drug delivery is thought to related to the ability to moisten the epithelial surface and to provide structure for the aqueous phase of the tear film in a manner analogous to natural mucins¹³.

There are many types of polymers which are used in ophthalmic drug delivery. Carbomers and Hydroxypropyl methylcellulose are discussed here.

Carbomer is a polymer of acrylic acid and forms hydrogel in water or alkaline solution due to hydration of the carboxyl groups in its structure. Carbomers are associated with:

- high viscosity at low concentrations
- quite stable to heat with negligible batch-to-batch variability
- unaffected by ageing

Tablet 1: List of prepared formulations

	Carbomer 934	HPMC	Sorbitol	Sodium Benzoate	Cromolyn Sodium
C1	0.5	-	7.6	0.1	2
C2	0.7	-	7.6	0.1	2
C3	1	-	5	0.1	2
C4*	1	-	7.6	0.1	2
C5	1.2	-	7.6	0.1	2
C6	1.3	-	3	0.1	2
C7	1.3	-	5	0.1	2
C8	1.3	-	7.6	0.1	2
C9	1.5	-	7.6	0.1	2
C10	-	0.7	3	0.1	2
C11*	-	1	3	0.1	2
C12	-	1	5	0.1	2
C13	-	1.2	7.6	0.1	2
C14	-	1.3	3	0.1	2
C15	-	1.3	7.6	0.1	2
C16	-	1.5	7.6	0.1	2

**All the mentioned formulations were tested in terms of physical appearance, pH and rheology. Formulations C4 and C11 were chosen to continue with below for further examination.*

- do not support bacterial or fungal growth
- non irritating.

The mentioned features make Carbomers to be used in preparing gel formulations for topical use by several workers¹⁴.

Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) is a propylene glycol ether of methylcellulose. The substituent R represents either a -CH₃, or a -CH₂CH(CH₃)OH group, or a hydrogen atom. The physicochemical properties of this polymer are strongly affected by

the methoxy and the hydroxypropyl group content beside the molecular weight.

It is considered as one of the most important hydrophilic carrier materials used for the preparation of oral and topical controlled drug delivery systems. Its high swell ability has a significant effect on the release kinetics of an incorporated drug. Upon contact with water or biological fluid the latter diffuses into the device, resulting in polymer chain relaxation with volume expansion¹⁵.

The main objective of this study was to formulate and evaluate a novel ocular drug delivery system of Cromolyn sodium to optimize its efficiency and bio-availability.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Cromolyn Sodium was supplied by Cambrex (Germany). Carbomer 934, HPMC and other chemical agents were purchased from Merk (Germany).

2.2. Determination of UV spectrum of cromolyn sodium

The Solution of Cromolyn Sodium in distilled water was prepared with a concentration of 25 µg/ml. The UV spectrum (Shimadzu 1240, Japan) of the solution was determined in the range of 200-400 nm at 25 °C against the distilled water control and was compared with Clark's Analysis of Drugs and Poisons reference¹⁶.

2.3. Determination of IR spectrum of cromolyn sodium

The IR spectrum of Cromolyn Sodium powder was prepared in the range of 4000-650 nm 16 by FTIR Spectrophotometer (IRAffinity-1S model, Shimadzu, Japan).

2.4. Preparation of Carbomer 934 gels

Carbomer 934 (0.5-10.5% w/w) was slowly added to the warm water with gentle mixing. After the formation of a clear viscous solution, a solution of the Cromolyn Sodium (2% w/w), Sorbitol as a humectant (3-7.6% w/w) and Sodium benzoate as a preservative (0.1% w/w) in sterile water was slowly added to the polymer solution and mix gently (Table 2). Drops of Sodium Hydroxide (0.5 N) were added to adjust the PH of the prepared solutions to range 5-6.

2.5. Preparation of HPMC gels

HPMC (0.7-1.5% w/w) was slowly added to warm

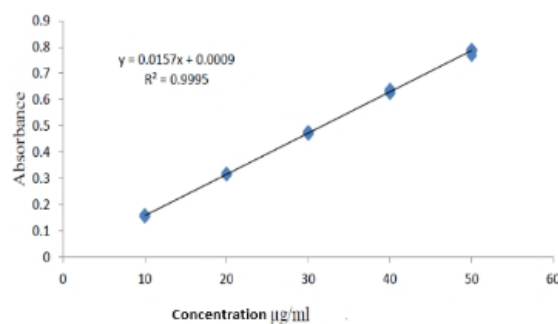


Figure 1: The standard curve of Cromolyn sodium.

water with gentle mixing. After complete addition of the polymer and mixing, a solution of Cromolyn Sodium (2% w/w), Sorbitol as a humectant (3-7.6% w/w) and Sodium benzoate as a preservative (0.1% w/w) in sterile water was slowly added to the polymer solution and mixed gently. The solutions were observed in the refrigerator for 10 days (Table 1).

2.6. Physical appearance

The formulations were inspected visually from a black and white background for their clarity. Homogeneity and spread ability were also tested on the skin¹⁷.

2.7. Drug content uniformity

To make sure about uniformity of formulations, we make a solution with 625mg of formulation in 500 ml of distilled water. Cromolyn sodium concentration was detected by measuring the absorbance by UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu 1240, Japan) at 365 nm, using the contents of at least 6 vials. Drug content was determined from the standard curve of Cromolyn sodium (Figure 1).

2.8. pH evaluation

The pH values of 2.5 g of gel in 25cc of water were evaluated by a pH meter (HANNA PH211, Italy)¹⁷.

2.9. Rheology studies

The determination of the viscosity of prepared gel for-

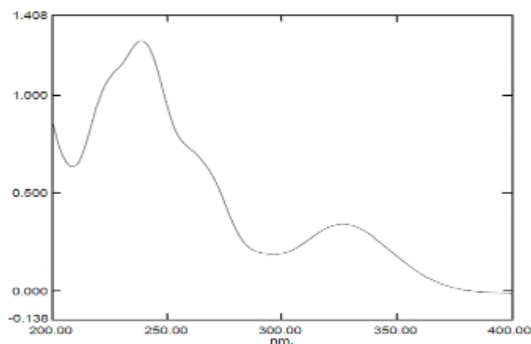


Figure 2: UV absorption spectrum of Cromolyn Sodium (326 nm).

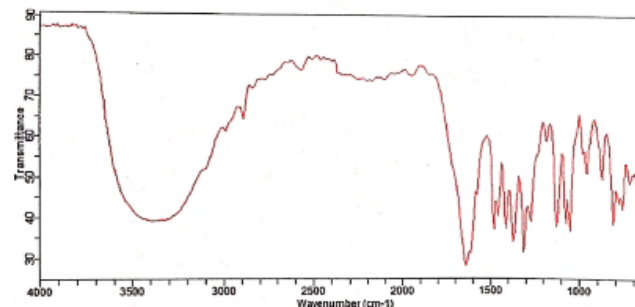


Figure 3: FTIR absorption spectrum of Cromolyn Sodium (650-4000 nm).

Table 2: Formulation C4 API content

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	Average	SD	%CV
Concentration (µg/mL)	25.13	25.81	24.56	25.64	25.69	24.84	25.28	0.51	2.02
Recovery (%)	100.52	103.24	98.24	102.56	102.79	99.38	101.12	2.05	2.02

Table 3: Formulation C11 API content

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	Average	SD	%CV
Concentration (µg/mL)	25.1	25.74	26.06	25.87	25.55	25.61	25.65	0.32	1.27
Recovery (%)	100.43	102.98	104.25	103.48	102.21	102.46	102.63	1.3	1.27

mulations was carried out using a Brookfield rheometer (Brookfield DV-III Ultra, Brazil). The spindle was rotated from 0.5 to 250 rpm. All samples were settled at the assay temperature (25 ± 1)°C for 30 min before each measurement. (Improved corneal bioavailability of ofloxacin: biodegradable microsphere-loaded ion-activated in situ gel delivery system)¹⁸.

2. 10. In vitro release study

In vitro release test was performed with the dialysis bag method. In this case, 1g of each formulation was dissolved in 2cc of STF (pH=7/4) and was placed in a dialysis bag. These bags were suspended in a dissolution apparatus consists of 20cc STF.

The dissolution medium was continuously stirred (25 rpm) using a magnetic stirrer at 25°C. The samples were withdrawn from different places of release media at intervals of 15 min, 30 min, 1, 2, 3, 4, 6 and 8 hr and replaced with an equal volume of fresh STF. The absorbance of withdrawn samples was measured at 326 nm to determine the concentration of Cromolyn Sodium. The experiment was carried out three times and the average values were reported¹⁹.

2.11. Kinetic analysis

In vitro release data were analyzed and the regression coefficients for various kinetic models, i.e. zero

Table 4: pH determination of formulation C4

S1	S2	S3	S4	S5	S6	Average	SD	%CV
7.1	6.91	6.77	7.01	6.9	6.75	6.9	0.13	1.97

Table 5: pH determination of formulation C11.

S1	S2	S3	S4	S5	S6	Average	SD	%CV
6.53	6.59	6.76	6.44	6.49	6.34	6.52	0.14	2.18

order, first order, power law model, Korsmeyer-Pepas 15 and Hixson-Crowell model 15 were calculated to determine the drug release mechanism.

2. 12. Isotonicity test

Isotonicity assay was done based on the cryoscopic method 20. Briefly, 50µl of each sample was adjusted to the instrument (Gonatec-osmomat 030). In this assay isotonicity test was calculated based on equation (1):

$$C_{\text{osm}} = \Delta t/k \quad (1)$$

where: C_{osm} = osmolality (osmol/kg)

Δt = freezing point depression

$K = 1.858 \text{ Ckg/osmol}$ (20).

2. 13. Sterility test

Ophthalmic preparations must be sterile and a sterility test should be performed for all of the formulations. Formulations were sterilized by autoclave at 80°C in 10 min. A sterility test was carried out under aseptic conditions, for aerobic and anaerobic bacteria and fungi by using fluid thioglycollate medium and SCDB medium. 1ml of each formulation was added to 10 ml of each medium, incubated for 14 days at 37°C in the fluid thioglycollate medium and at 25°C in SCDB medium to detect any bacteria growth ²⁰.

2. 14. Stability test

A stability study for formulations were performed

under accelerated storage condition. Formulations were kept at 4°C and 40°C for 10 days and were changed every 24 hours and then evaluated for active drug content, pH and rheology. all the parameters were estimated after 3 months.

3. Results and discussion

3.1. Evaluation of Cromolyn Sodium

3.1.1. UV Absorption

As it was mentioned in the section of materials and methods, UV absorption of API has been compared with Clark's Analysis of Drugs and Poisons reference and it is shown in Figure 2.

3.1.2. FTIR Absorption of Cromolyn Sodium

Figure 3 depicts on the FTIR absorption spectrum of API in wavelengths of 650-4000 nm.

3.2. Evaluation of selected formulations

3.2.1. Characterization of hydrogels

Transparency and spreading on the skin of formulated hydrogels were acceptable ¹⁷.

3.2.2. Determination of API content

Formulation C4 and formulation C11 were examined and the related results are shown in Tables 2 and 3.

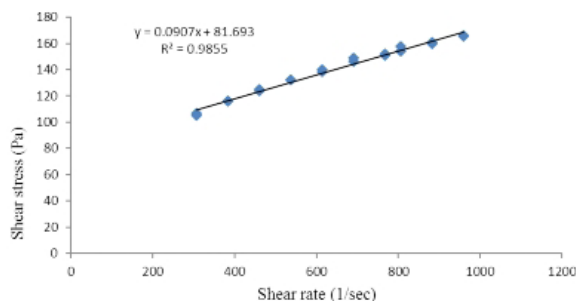


Figure 4: Rheology of formulation C4 (Shear rate: 307-960 1/sec).

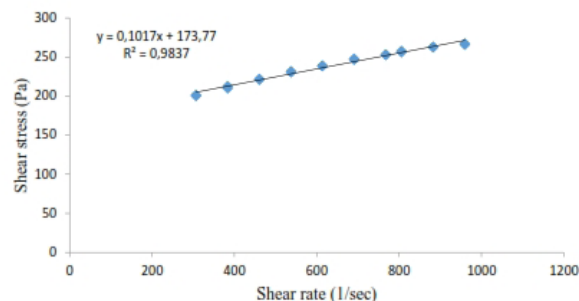


Figure 5: Rheology of formulation C11 (Shear rate: 307-960 1/sec).

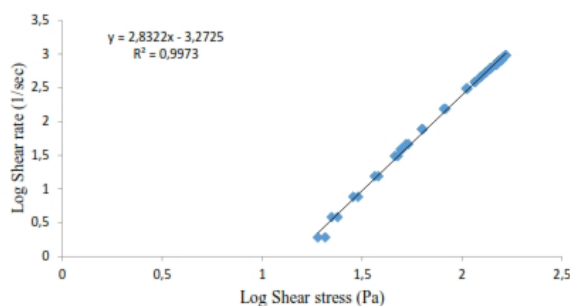


Figure 6: Logarithmic Rheogram of formulation C4 (Shear rate: 307-960 1/sec).

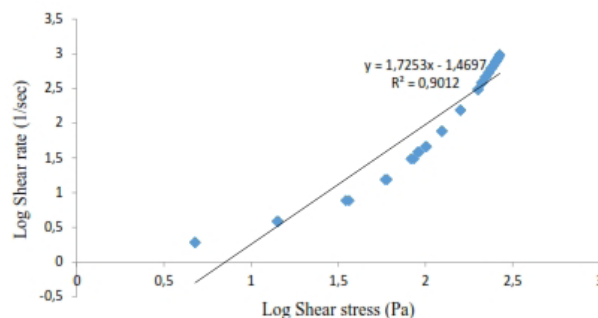


Figure 7: Logarithmic Rheogram of formulation C11 (Shear rate: 307-960 1/sec).

As it is mentioned in the USP 21, an amount of 90-110 % Cromolyn sodium as API is acceptable in an eye drop dosage form. Formulations C4 and C11 showed an average content of 101.12 ± 2.02 and 102.63 ± 1.27 and they are proved suitable²¹.

3.2.3. pH evaluation measurements

Tables 4 and 5 show pH determination of selected formulations.

Ocular dosage forms must acquire a pH of 4.5-11.5 to increase the compatibility of patients. After evaluation of selected formulations about the pH, obtained results were showed compatible values 6.9 and 6.52¹⁷.

3.2.4. Rheology

Line slope of Figure 4 exhibits the viscosity of formulation as 90.7 cp and the width of origin shows the fluid threshold as 81.693 Pa. Figure 5 exhibits

the viscosity of formulation as 101.7cp and the fluid threshold as 173.77 Pa.

As it is shown in Figures 6 and 7, prepared formulations C4 and C11 exhibited pseudoplastic flow behavior due to line slope greater than 1. Also, as the shear rate increases, viscosity decreases and it declares the non-thixotropic behavior. The mentioned behavior results in rapid recovery of hydrogel formulation after pressure and high efficiency of ocular dosage forms²².

The rheology of selected formulations was determined and compared with Liposic® as a standard sample (Figure 8). In a Comparison of C4, C11 and Liposic formulation as a standard sample, we conclude that the viscosity of two formulations Liposic and C11 are approximately similar. The C4 sample has lower viscosity besides the lower rate of fluid threshold and these can bring improved exit of formulation from its tube into the eye²².

Table 6: Kinetic release patterns of formulation C4

Model	Zero order	First order	Power law	Hixon-Crowell	Korsmeyer-Peppas
R2	0.9434	0.9587	0.9996	0.8934	0.9998 $n^* = 0.4658$
k	0.3077	-0.0071	11.531	-0.0226	0.0936

* $n < 0.5$ = Drug transport mechanism is Fickian diffusion.

Table 7: Kinetic release patterns of formulation C11

Model	Zero order	First order	Power law	Hixon-crowell	korsmeyer-peppas
R2	0.9209	0.9749	0.9955	0.9211	0.9948 $n^* = 0.4619$
0.0988	-0.0155	8.8848	-0.0045	0.2303	k

* $n < 0.5$ = Drug transport mechanism is Fickian diffusion.

3.2.5. Dissolution test

The rate of the released drug from formulations C4 and C11 are shown in Figures 9 and 10, respectively. Regarding Figure 9, about 63% of the total loaded drug was released in one hour and during the first four hours a complete release was observed.

Figure 10 showed that about 50% of the total loaded drug was released in one hour and during the first six hours, a complete release from the formulation was observed. This formulation is more long-acting in comparison with C4.

3.2.6. Kinetic release pattern

The results related to five kinetic release patterns of the formulations are listed in tables 6 and 7.

By evaluating numerous kinetic models and in regard to the R2, we obtained that the greatest coefficient correlation of formulation C4 and C11 is relat-

ed to follow the Power Law model R2 as 0.9996 and 0.9955 respectively and Korsmeyer-Peppas model R2 as 0.9998 and 0.9948. C4 and C11 follow the models of Korsmeyer-Peppas and Power Law and it means that the amount of released drug is in direct relation with the factor of time power 0.43. The formulations with this model of kinetic release the entrapped drug with the diffusion mechanism according to equation (2)²³.

$$\log Q_t = n \log t + \log K_p + \log Q_0 \quad (2)$$

where : K_p = Pepas kinetics constant

Q_t = Percentage of the released drug at the specific time

Q_0 = Initial amount of drug

n = The slope of the line that indicates the mechanism of drug release

3.2.7. Osmolarity calculation

The osmolarity of formulation C4 is reported as $1.758 \pm 0.006\%$ NaCl. ($n=3$) and the result for the

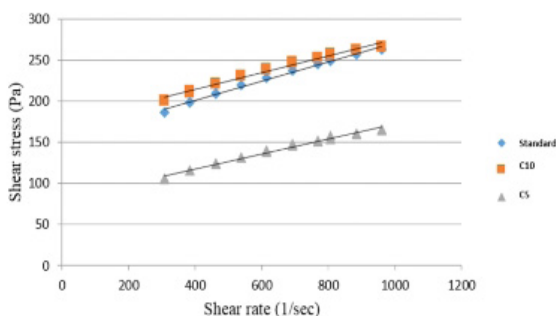


Figure 8: Comparison of Rheology of formulations C4, C11 and Liposic® (Shear rate: 307-960 1/sec).

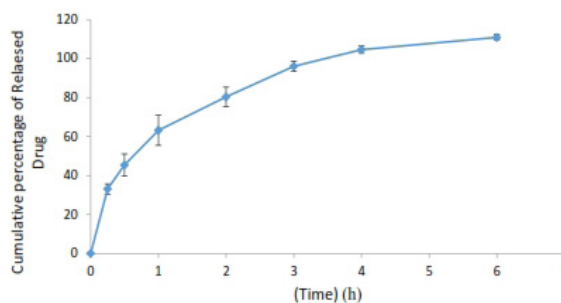


Figure 9: The cumulative percentage of released drug from formulation C4 in STF, pH 7.4, 25°C. Mean $\pm$ SD (n=3).

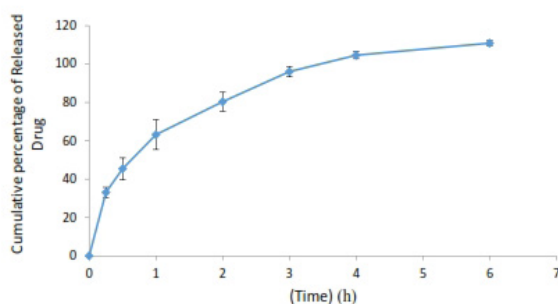


Figure 10: The cumulative percentage of released drug from formulation C11 in STF, pH 7.4, 25°C. Mean $\pm$ SD (n=3).

other formulation is $1.072 \pm 0.011\%$ NaCl. (n=3). The observed results are acceptable as forms have this range of osmolarity²⁰.

3.2.8. Accelerated stability

The prepared samples of two formulations C4 and C11 remained transparent after the observed period of about 10 days. In addition, their API content was investigated and the results are $98.5 \pm 1.3\%$ and $100.07 \pm 0.28\%$ for C4 and C11 respectively. pH is also calculated as 6.8 ± 0.11 and 6.5 ± 0.17 . The other factor which is considered is Viscosity that is determined 92.2 ± 0.5 cP for formulation C4 and 102.3 ± 0.8 cP for formulation C11.

The observed samples after 3 months also revealed the same transparency and spreading. The

amount of API for formulation C4 is 96.13 ± 0.67 , pH and viscosity of this formulation are 6.6 ± 0.14 and 92.8 ± 0.4 cP, respectively. The drug content, pH and viscosity of formulation C11 are listed as 98.18 ± 1.1 , 6.3 ± 0.11 and 100.5 cP.

3.2.9. Sterility test

There is no turbidity in media SCDB and fluid Glycolate after two weeks incubation at 25 and 37 °C. There is also no difference in API content and viscosity of selected formulations²².

Ocular Allergic diseases cause increased production of tears and thus removing the applied drug such as Cromolyn Sodium is occurred and leading to an insufficient amount of the drug can be absorbed. Sustained ocular drug delivery can retain in their area of application and release the drug in a sustained method. So, these types of drug delivery can be considered novel and improved. Designing the ocular hydrogel can be a functional method to improve the compliance of patients.

In this study, was developed hydrogel containing Cromolyn sodium to improve the delivery of this drug to the eyes. Synthetic formulations of different portions of Cromolyn sodium, sorbitol and two polymers of HPMC and carbomer 1% as a gel formulation base ingredient were prepared. we investigated Their physical appearance, pH and viscosity. By increasing polymer, the viscosity increased too. Adding the API, preservatives and sorbitol to the gel containing polymer results in

decreased viscosity. The optimized formulations were chosen with ingredients of Carbomer 1%, Sorbitol 7.6% and HPMC 1%, Sorbitol 3%. The two selected samples of optimized formulations C4 and C11 were evaluated of supplemental tests such as dissolution, isotonicity, short term stability, API content assay and sterility. The reports of content assay and viscosity were acceptable based on Cromolyn sodium eye drop monograph and in comparison, with the market sample as it was reported 101.12 ± 2.02 and 102.63 ± 1.27 about C4 and C11. In addition, the pH and osmolarity of mentioned formulations were also acceptable as an eye dosage form. Both synthetic samples follow non-thixotropic and pseudoplastic behavior regard to their kinetic release of the entrapped drug. As the total drug content of formulations were released

during 4 hours, and also considerable stability in short term test, the interval application of hydrogel can be decreased.

In conclusion, our study demonstrated that the ocular hydrogel formulation of Cromolyn Sodium can be considered as a novel therapeutic agent in ophthalmologic drug delivery by its with improved features about patient compliance, sustained release of drug and higher absorption of the drug. □

Funding/Support

The authors would like to thank the School of Pharmacy, Shahid Beheshti University (Tehran, Iran) for financial support of this study.

Conflict of interest:

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. Agarwal R., Iezhitsa I., Agarwal P., Abdul Nasir N.A., Razali N., Alyautdin R., Ismail N.M. Liposomes in topical ophthalmic drug delivery: an update. *Drug. Deliv.* 23, 1075-1091, 2016.
2. Järvinen, T., Riku N. (2007) Prodrug approaches to ophthalmic drug delivery. *Prodrugs*. Springer, New York, NY 2, vol. 1, p.p. 125-155.
3. Dubald M., Bourgeois S., Andrieu V., Fessi H. Ophthalmic drug delivery systems for antibiotherapy-a review. *Pharmaceutics*. 10, 10, 2018.
4. Kushwaha S.K., Saxena P., Rai A.K. Stimuli sensitive hydrogels for ophthalmic drug delivery: a review. *Int. J. Pharm.* 2, 54, 2012.
5. Ding S. Recent developments in ophthalmic drug delivery. *Pharmaceut. Sci. Tech.* 8, 328-335, 1998.
6. Al-Kinani A.A., Zidan G., Elsaid N., Seyfoddin A., Alani A.W., Alany R.G. Ophthalmic gels: Past, present and future. *Drug. Deliv. Rev.* 126, 113-126, 2018.
7. Le Burlais C., Acar L., Zia H., Sado P.A., Needham T., Leverage R. Ophthalmic drug delivery systems-recent advances. *Prog. Retin. Eye. Res.* 17, 33-58, 1998.
8. Robin J.S., Ellis P.P. Ophthalmic ointments. *Surv. Ophthalmol.* 22, 335-340, 1978.
9. Lin D., Lei L., Shi, S., Li X. Stimulus-responsive hydrogel for ophthalmic drug delivery. *Macromol. Biosci.* 19, 1900001, 2019.
10. Kirchhof S., Goepferich A.M., Brandl F.P. Hydrogels in ophthalmic applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 95, 227-238, 2015.
11. Achouri D., Alhanout K., Piccerelle P., Andrieu V. Recent advances in ocular drug delivery. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 39, 1599-1617, 2013.
12. Saettone M.F., Giannaccini B., Ravecca S., La Marca F., Tota G. Polymer effects on ocular bioavailability—the influence of different liquid vehicles on the mydriatic response of tropicamide in humans and in rabbits. *Int. J. Pharm.* 20, 187-202, 1984.
13. Wilson C.G., Zhu Y.P., Frier M., Rao L.S., Gilchrist P., Perkins A.C. Ophthalmol: Ocular contact time of a carbomer gel (Gel Tears) in humans. *Br. J.*

- Ophthalmol.* 82, 1131-1134, 1998.
14. Taş Ç., Ozkan Y., Savaşer A., Baykara T. In vitro and ex vivo permeation studies of chlorpheniramine maleate gels prepared by carbomer derivatives. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 30, 637-647, 2004.
15. Siepmann J., Peppas N.A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 64, 163-174, 2012.
16. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. (2004) 4rd edition Edited by Anthony C. Moffat, M. David Osselton, and Brian Widdop Publisher: Pharmaceutical Press, London. vol. 1, p.p. 2058-2059.
17. Salam Mohammed H., Makame Mwadini A., Wadi N.M.A., Ahuja A. Formulation and evaluation of ophthalmic antibacterial gels and comparison of different polymers using factorial design. *J. Clin. Res. Repo.* 3, 1-7, 2020.
18. Cao F., Zhang X., Ping Q. New method for ophthalmic delivery of azithromycin by poloxamer/carbopol-based in situ gelling system. *Drug. Deliv.* 17, 500-507, 2010.
19. Güven U.M., Berkman M.S., Şenel B., Yazan Y. Development and in vitro/in vivo evaluation of thermo-sensitive in situ gelling systems for ocular allergy. *Braz. J. Pharm. Sci.* (2019) 55: 1-11.
20. Hareesh Reddy M., Sambasivarao K., Rao Baru C. Methods of adjusting tonicity and pH values of some drugs and substances. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 3, 207-212, 2016.
21. USP (The United States Pharmacopeia). (2017) United book press, Inc, Baltimore, MD. vol. 1, p.p. 1172.
22. Jain P., Jaiswal C.P., Mirza M.A., Anwer M.K., Iqbal Z. Preparation of levofloxacin loaded in situ gel for sustained ocular delivery: in vitro and ex vivo evaluations. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 46, 50-56, 2020.
23. Vennat B., Gross D., Pouget M.P., Pourrat A., Pourrat H. Comparison of the physical stability of astringent hydrogels based on cellulose derivatives. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 21, 559-570, 1995.



ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ - MEETINGS

• **APRIL 18-20, 2022, TOKYO, JAPAN**

INTERNATIONAL MEET ON PHARMACEUTICS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS (PHARMAMEET2022)

<https://www.albedomeetings.com/pharmameet/index.php>

• **MAY 16-19, 2022 | VOLGOGRAD, RUSSIA**

5TH RUSSIAN CONFERENCE ON MEDICINAL CHEMISTRY

Info: <https://medchem21.com/index.php/en/home-english/> medchemvolga21@gmail.com

• **JUNE 23-2, 2022 BRATISLAVA SLOVAKIA**

12TH JOINT MEETING ON MEDICINAL CHEMISTRY 2022

<https://www.jmmc2022.sk/>

• **JULY 1-2, 2022 THESSALONIKI**

8^ο ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΜΕΤΡΟΛΟΓΙΑΣ

www.greekmetrology.gr/conferences/8th-metrology-conference/

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

XXVII EFMC INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MEDICINAL CHEMISTRY

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

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

EFMC YOUNG MEDICINAL CHEMISTS' SYMPOSIUM

www.efmc-ymcs.org

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

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

www.euroqsar2022.org

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

BIOAVAILABILITY- BIOEQUIVALENCE,

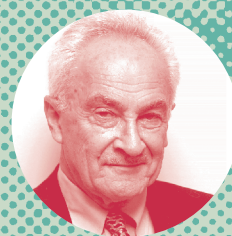
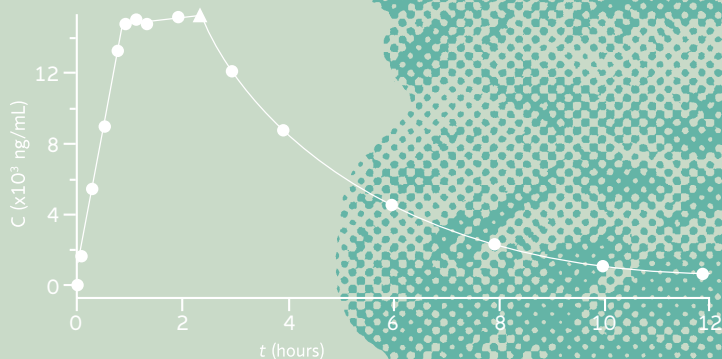
Info: P. Macheras, Faculty of Pharmacy, University of Athens



Organized by
UNIVERSITY OF ATHENS
FACULTY OF PHARMACY
EMERITUS PROF.
PANOS MACHERAS

3-4
Oct
2022

Main
Building
University
of Athens
Athens
Greece



Hybrid
Conference
in Memory of
Professor
Laszlo Endrényi

Bioavailability- Bioequivalence

From Classification
to Virtualisation &
Anything in Between

