

Modelowanie komputerowe w badaniach nad lekiem – przewidywanie potencjalnych działań toksycznych

Barbara Wiśniowska, Sebastian Polak

Pracownia Farmakoepidemiologii i Farmakoekonomiki, Katedra Toksykologii CM UJ w Krakowie

Adres do korespondencji: Sebastian Polak, Katedra Toksykologii UJ CM, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, tel. 012 658 82 14

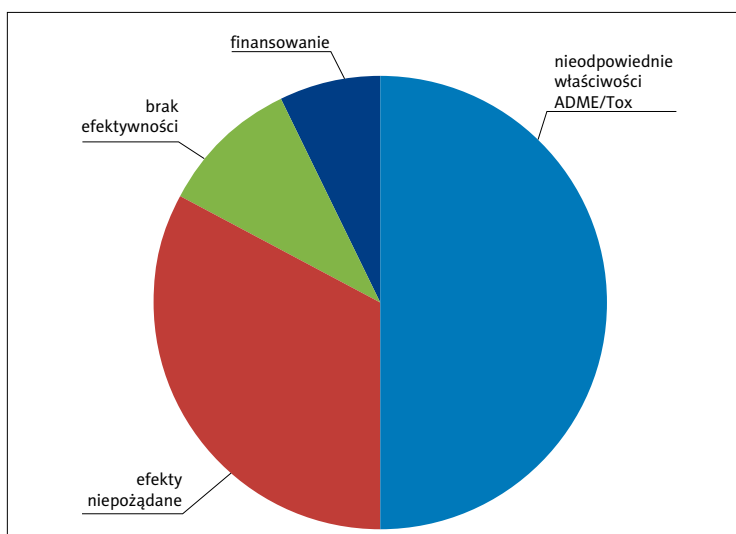
Kolejny etap wirtualnego doświadczenia rozpoczynamy ze zbioru kilku-kilkunastu cząstek o zoptymalizowanych właściwościach biologicznych, jednak do celu procesu R&D – rejestracji nowej substancji leczniczej – droga jest jeszcze daleka. Duże powinowactwo cząstki do receptora i pożądane właściwości ADME są niezbędne, ale niewystarczające do osiągnięcia sukcesu, nie gwarantują, że zostanie ona nowym lekiem. Wybór molekuł do dalszych etapów badań zależy od zbalansowania nasilenia aktywności w miejscu działania, selektywności, preferowanych właściwości ADME z ich bezpieczeństwem, dlatego często całość prac związana z opisywanymi zagadnieniami jest w skrócie przedstawiana jako ADMET lub ADME-Tox. Minimalizacja ryzyka związanego ze stosowaniem leku u ludzi jest konieczna, jednak całkowite jego wykluczenie nie jest ani możliwe ani praktyczne, dlatego celem badań przedklinicznych i klinicznych jest optymalizacja stosunku przewidywanego ryzyka do oczekiwanych korzyści klinicznych. Działania toksyczne, obok braku efektywności i niewłaściwego profilu ADME – właściwości, które staraliśmy się zoptymalizować w poprzednich etapach wirtualnego projektowania i badania naszego przyszłego leku – są jedną z głównych przyczyn niepowodzeń zarówno podczas rozwoju nowych potencjalnych leków (rycina 1), jak i po ich wprowadzeniu na rynek.

Jak wspomniano w pierwszym artykule tego cyklu, znaczny wzrost wymagań, stawianych nowym lekiem przez agencje rejestrujące (FDA, EMEA), dotyczących m.in. bezpieczeństwa, skutkuje zwiększeniem odsetka cząstek odrzucanych na kolejnych etapach rozwoju, a co za tym idzie – zwiększeniem kosztów wprowadzenia nowego leku na rynek i zmniejszeniem opłacalności całego procesu. Stąd wynika obowiązująca w przemyśle farmaceutycznym strategia i powtarzane uparcie stwierdzenie – *fail early, fail cheap* – co można przetłumaczyć jako „szybkie niepowodzenie to tanie niepowodzenie”. Im szybciej zostanie odkryte

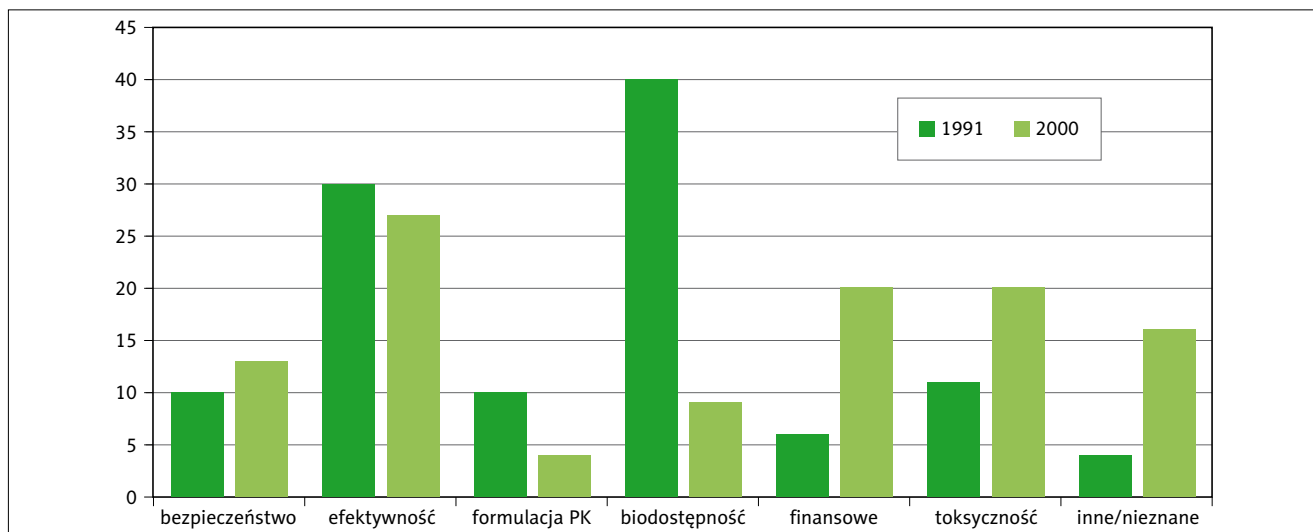
Computer modeling in drug research – toxicity prediction · One of the major reasons of drug failures during development process and high attrition rates are inappropriate ADME profile and toxicological properties of compounds. Thus, *in silico* toxicology testing emerged as an important area in toxicology field and has gained much attention in the pharma industry and regulatory agencies. Computational toxicology (toxinformatics) is a growing research area that is melding advances in molecular biology and chemistry with modeling and computational science. A wide range of the molecular modeling techniques, expert- and data based systems provide tools for risk assessment and predictions for multitude toxicological endpoints. This paper explains general settings of *in vitro* and *in vivo* toxicological endpoints predictions, in addition *in vitro* hepato- and cardiotoxicity evaluation models are characterized in more detailed way.

Keywords: toxicity prediction, mathematical modelling, hepatotoxicity, cardiotoxicity

© Farm Pol, 2009, 65(6): 445-452



Rycina 1. Przyczyny eliminacji potencjalnych leków w procesie R&D



Rycina 2. Główne przyczyny odrzucenia cząstek w procesie badania i rozwoju w roku 1991 i 2000 przedstawione jako odsetek całości

działanie czy właściwość cząstki uniemożliwiającej jej zastosowanie w leczeniu, tym mniejsze będą straty finansowe firmy. Istnieje więc potrzeba zastosowania technik i narzędzi umożliwiających odrzucenie takich cząstek na możliwie wczesnym etapie procesu rozwoju leku, zanim cząstka osiągnie etap badań klinicznych czy późne etapy testów przedklinicznych, których koszty stanowią główną część całkowitych ponoszonych przez przemysł farmaceutyczny wydatków. Efektywność metod projektowania w warunkach *in silico* można zaobserwować na wykresie przedstawiającym procentowo przyczyny odrzucenia cząstek w procesie badania i rozwoju w roku 1991 i 2000 (rycina 2). Wyraźne zmniejszenie odsetka struktur eliminowanych z powodu nieodpowiednich właściwości farmakokinetycznych i niskiej biodostępności jest efektem rutynowo przeprowadzanego na początku procesu R&D projektowania i oceny tych parametrów za pomocą modelowania komputerowego. Podobnych rezultatów można się spodziewać jako wyniku skringingu i modelowania toksycznych właściwości cząstek.

Wartość metod *in silico* wynika z możliwości ich zastosowania we wczesnych etapach badań, nawet przed zsyntetyzowaniem cząstki. Wirtualny skringing bibliotek cząstek umożliwia szybkie wybranie spośród tysięcy zaprojektowanych struktur o najbardziej zbliżonych do optymalnych właściwościach. Na tym etapie odrzuca się na przykład cząstki, w których strukturze znajdują się fragmenty (toksykofory) warunkujące określone działanie toksyczne tzw. alerty strukturalne. Wysoka sprawność narzędzi *in silico* – możliwość testowania znacznych ilości związków w stosunkowo krótkim czasie – znacznie skraca fazę poszukiwania struktur wiodących. W dalszym etapie syntezy chemicznej podlegają jedynie wyselekcjonowane związki, dla których prawdopodobieństwo odrzucenia w kolejnych fazach testów jest najmniejsze.

Zastosowanie modelowania komputerowego podczas badań nad bezpieczeństwem potencjalnych leków pozwala wskazać obszary wymagające dokładnej oceny *in vivo*, co sprawia że w badaniach klinicznych testowane są cząstki bezpieczniejsze dla biorących w nich udział pacjentów oraz z największą szansą na spełnienie wymogów agencji rejestrujących leki.

Predykcja właściwości toksycznych i działań niepożądanych jest jednak zadaniem bardziej złożonym i trudniejszym niż projektowanie właściwości ADME. Po pierwsze, określenie „toksyczność” obejmuje szeroki zakres efektów. Niekiedy bardzo podobne strukturalnie cząstki mogą powodować różnie wyrażone efekty toksyczne, a określony efekt może być związany ze złożonym działaniem różnych cząstek czy przez różne mechanizmy. Dlatego nie ma możliwości kompleksowego modelowania toksyczności jako takiej, w ogólnym znaczeniu wywierania jakiegokolwiek szkodliwego działania na organizm. W badaniach określa się w warunkach *in silico*, *in vitro* czy *in vivo* poszczególne punkty końcowe m.in.:

- działanie kancerogenne,
- działanie kardiotoksyczne,
- działanie hepatotoksyczne,
- działanie drażniące na skórę i na oko,
- toksyczny wpływ na rozrodczość,
- teratogenność,
- ryzyko fosfolipidozy,
- działanie fototoksyczne i fotouczulające,
- reakcje idiosynkratyczne,
- nefrotoksyczność,
- neurotoksyczność,
- hematotoksyczność.

Opis przykładowych modeli stworzonych do predykcji działania hepato- i kardiotoksycznego znajdują Państwo w dalszej części tego artykułu.

Modelowanie efektów toksycznych ma zarówno charakter jakościowy (wystąpienie danego efektu

lub jego brak), jak i ilościowy (LD₅₀ – średnia dawka toksyczna, LOAEL – najniższa dawka, która powoduje ujawnienie efektu toksycznego, NOAEL – największa dawka, która nie powoduje ujawnienia efektu toksycznego, MTD – maksymalna dawka tolerowana, MRDD – maksymalna dawka zalecana i in.).

Bezpośrednie efekty toksyczne, często będące rezultatem bioaktywacji cząstki macierzystej do związków toksycznych, zwłaszcza elektrofilnych metabolitów, które mogą kowalencyjnie wiązać się do makromolekuł komórkowych, są przeważnie połączone z pewnymi określonymi grupami funkcyjnymi cząstek – to wspomniane już wcześniej alerty strukturalne. Dlatego są one łatwiejsze do przewidzenia i modelowania metodami SAR (*Structure-Activity Relationship*) na wczesnych etapach badań niż działania niepożądane związane z aktywnością farmakodynamiczną danej struktury. Jedną z możliwości jest symulacja interakcji małych cząstek z receptorami o udowodnionym powiązaniu z wieloaspektową toksycznością (np. receptor PPAR, receptor glukokortykoidowy, receptor AH) i o znanej strukturze krystalicznej (modelowanie molekularne), do której wirtualnie przyłącza się badaną cząstkę, oceniając prawdopodobieństwo wystąpienia takiego połączenia i jego trwałość.

Przyjęcie ryzyka stosowania danego leku w każdym przypadku dodatkowo utrudnia wysoki stopień zależności występowania i nasilenia takiego działania od wielu różnych i zmiennych osobniczo czynników. Obserwowany efekt toksyczny może być specyficzny dla danego gatunku czy organu, co utrudnia skalowanie allometryczne efektu toksycznego oraz ekstrapolowanie wyników *in vitro* na warunki *in vivo* u ludzi. Odpowiedź organizmu na podanie leku może być również modyfikowana przez płeć, wiek, fenotyp metaboliczny, schemat dawkowania w podaniu przewlekłym i inne czynniki, a modelowanie zmienności wewnątrz- i międzypersonicznej podczas eksperymentów *in vitro* i *in silico* jest niezwykle trudne.

Kluczowym elementem predykcji działań toksycznych jest jakość wykorzystywanych danych. W każdym modelu kluczowe znaczenie dla sprawności i zdolności generalizacji mają informacje zastosowane do jego konstrukcji, ich jakość, spójność oraz reprezentatywność. Obecnie dostępność wysokiej jakości danych z doświadczeń *in vitro* uzyskanych w standardowych warunkach czy danych dotyczących toksyczności u ludzi jest niewielka. Wraz ze wzrostem znaczenia metod alternatywnych w badaniu bezpieczeństwa leków podejmuje się jednak różne inicjatywy, w których jednym z celów jest opracowanie i publikacja toksykologicznych baz danych.

Istnieje wiele programów komercyjnych i dostępnych w ramach licencji zezwalających na bezpłatne korzystanie, w tym za pośrednictwem internetu, służących do predykcji działań toksycznych (tabela),

ponadto firmy farmaceutyczne (ale także chemiczne czy kosmetyczne) używają własnych algorytmów i modeli budowanych na podstawie własnych bibliotek i na swój wewnętrzny użytek.

Wykorzystywane m.in. przez przemysł farmaceutyczny techniki komputerowej predykcji toksyczności można ogólnie podzielić na trzy kategorie – modelowanie molekularne, systemy ekspertowe oraz systemy oparte na danych.

Modelowanie molekularne obejmuje metody modelujące zdarzenia biochemiczne istotne z punktu widzenia toksyczności. Analogiczne do opisanych w pierwszym artykule tego cyklu techniki modelowania molekularnego stosowane podczas selekcji, optymalizacji i oceny właściwości ADME cząstek wiążących można również wykorzystać do predykcji działań toksycznych, jeżeli w mechanizmie danego efektu pośredniczy receptor (np. cytochrom P450, receptor estrogenowy) i znana jest struktura białka receptorowego. Techniki te jednak nie są odpowiednie do modelowania i predykcji toksyczności uwarunkowanej złożonymi i częściowo nieznanymi mechanizmami.

Systemy ekspertowe są oparte na ogólnych regułach wiążących aktywność biologiczną ze strukturą cząstki. Ich podstawą jest usystematyzowana wiedza ekspertów z dziedziny toksykologii oraz interpretacje danych toksykologicznych. Tworzenie bazy wiedzy dla systemu ekspertowego wymaga przeprowadzenia rozległego i dobrze zaplanowanego przeglądu literatury oraz „przetłumaczenia” specyficznych przypadków na generalne zasady. Dzięki temu predykcja jest możliwa nawet wtedy, gdy dostępnych jest niewiele danych eksperymentalnych (np. biotransformacja czy prognozowanie punktów końcowych związanych ze zdrowiem człowieka). Ponadto w tego rodzaju systemach możliwa jest integracja różnorodnej informacji chemicznej i biologicznej (pomiaru *in vivo* i *in vitro*, właściwości cząstek – doświadczalne i obliczone, fragmenty struktury i in.) dzięki specyficznej elastyczności działania ludzkiego mózgu, pozwalającej na ich interpretację. Jednym z intensywnie rozwijanych działów tego obszaru wiedzy, jest konstrukcja automatycznego lub półautomatycznego systemu wnioskowania, a więc mówiąc w bardzo dużym uproszczeniu – systemu naśladującego funkcjonalnie ludzki mózg, który pozostaje wciąż niedoścignutym wzorem. Celem jest właśnie skrócenie czasu oczekiwania na decyzję systemu i wzrost jego skuteczności, a testowane metody oparte są na najbardziej zaawansowanych technikach modelowania matematycznego.

Niektóre z dostępnych programów wykazują stosunkowo wysoką specyficzność (nawet do 80%), jednak

Działania toksyczne, obok braku efektywności i niewłaściwego profilu ADME – właściwości, które staraliśmy się zoptymalizować w poprzednich etapach wirtualnego projektowania i badania naszego przyszłego leku – są jedną z głównych przyczyn niepowodzeń zarówno podczas rozwoju nowych potencjalnych leków, jak i po ich wprowadzeniu na rynek.

wszystkie tego typu programy cechuje niska czułość, zazwyczaj około 50%. Systemy ekspertowe są stosowane w badaniach nad potencjalnym lekiem i wykorzystywane do „oznakowania” substancji, co skutkuje zwróceniem na te cząstki baczniejszej uwagi podczas dalszych etapów, nie przesądzając jednak czy przewidziane działanie w istocie wystąpi. Niewątpliwą zaletą systemów eksperckich jest transparentność predykcji. Ponieważ system taki zwykle zbudowany jest z zestawu reguł JEŻELI – TO, stosunkowo łatwo jest zidentyfikować przyczyny i uzasadnienie danej odpowiedzi systemu, co ułatwia zrozumienie i dalszą ocenę przewidzianego efektu. Taka konstrukcja pozwala na łatwe przeszukiwanie bazy wiedzy i uzyskanie potrzebnych informacji. Prostsza w porównaniu z systemami bazującymi na danych budowa modelu pozwala łatwo dodać kolejne reguły, zaktualizować wiedzę czy usunąć jej część bez konieczności przebudowy modelu. Na przykład firma Novartis, używająca komercyjnego programu DEREK, aby zwiększyć możliwość jego praktycznego zastosowania w interesujących ją obszarach, dołączyła do jego bazy danych własne informacje z obszaru, który nie był dobrze reprezentowany.

Budowa systemów ekspertowych umożliwia również dzielenie się danymi, bez konieczności ujawniania i udostępniania danych poufnych. Jedną z największych wad takich systemów może być nieadekwatna, nieprecyzyjna baza wiedzy, gdzie zasady ogólne są konstruowane na podstawie kilku tylko przykładów. Dla tego rodzaju systemów niezwykle istotne jest regularne aktualizowanie wiedzy i dołączanie do niej nowych dowodów naukowych. Trudne jest także formalne zdefiniowanie tzw. domeny zastosowalności i prawidłowej walidacji systemów ekspertowych, ponieważ bardzo często nie jest jasne, jakie cząstki posłużyły do budowy bazy wiedzy i w jakich warunkach przeprowadzono doświadczenie, którego wynik został zapisany i wykorzystany.

Systemy oparte na danych (statystyczne, empiryczne) – do budowy modeli predykcyjnych konieczne są dane doświadczalne oraz obliczone ze struktury cząstki. Na podstawie zestawu różnego rodzaju parametrów, za pomocą różnorodnych metod statystycznych, systemy te uczą się i odkrywają matematyczne zależności pomiędzy niejednorodnymi elementami zbioru uczącego. Typowym przykładem takiej procedury są zależności (Q)SAR. Klasyczna analiza QSAR stosuje techniki regresji, pozwalające opracować na podstawie danych równanie, które może być wykorzystane do przewidywania dla cząstek o podobnej strukturze (np. kongenerów) i mechanizmie działania. Szczególnie istotny dla poprawnego

działania systemów statystycznych jest odpowiedni dobór właściwości chemicznych istotnych z punktu widzenia badanego efektu toksycznego. Wskazanie tych parametrów *a priori* oraz zagwarantowanie, że żadne istotne cechy nie zostały pominięte jest niezwykle trudne.

Modele statystyczne są znacznie częściej niż systemy ekspertowe wykorzystywane do predykcji właściwości cząstek. Ponieważ doświadczenia badające toksyczność są zwykle kosztowne i czasochłonne, techniki drążenia danych zyskały sobie w ostatnich latach znaczną popularność. Należą do nich m.in.: metoda cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS), regresja wieloczynnikowa, metoda wektorów nośnych (SVM), sztuczne sieci neuronowe, metody rekursywnego podziału (drzewa klasyfikacyjne i regresyjne), metoda k-najbliższych sąsiadów, analiza dyskryminacyjna, techniki oparte na logice bayesowskiej i inne. Oprócz prawidłowej predykcji określonych efektów istotnym zadaniem systemów statystycznych jest identyfikacja cech chemicznych odpowiedzialnych za wystąpienie obserwowanego działania, co może umożliwić chemikom optymalizację cząstki. Należy zaznaczyć, że modele matematyczne przewidują jedynie korelację pomiędzy strukturą czy właściwościami cząstki, a określonym efektem biologicznym, jednak odkryta korelacja nie jest jednoznaczna ze związkami przyczynowo-skutkowym.

Ocena działań toksycznych w warunkach *in silico* jest obecnie wykorzystywana jako dodatkowe, równoległe do doświadczeń *in vitro* źródło informacji. Zastosowanie tego rodzaju metod pozwala na zminimalizowanie użycia zwierząt doświadczalnych przez ukierunkowanie badań lub eliminację cząstek toksycznych już na wcześniejszych etapach projektu. Techniki modelowania komputerowego umożliwiają również przewidywanie działań niepożądanych, których nie można zaobserwować u zwierząt (np. nudności, zawroty i bóle głowy, zaburzenia funkcji poznawczych). Konieczność rozwoju alternatywnych metod badania toksyczności leków dostrzega nie tylko przemysł farmaceutyczny. Program REACH (*Registration, Evaluation, and Authorization of Chemicals*) – aktualnie obowiązująca europejska polityka oceny chemikaliów (w tym m.in. leków) kładzie duży nacisk na rozwój predykcyjnych metod oceny toksyczności chemikaliów w warunkach *in silico* w celu minimalizacji konieczności wykonywania testów na zwierzętach oraz oszczędności czasu i zasobów. Oceną potencjału toksykologii predykcyjnej zajmuje się także zespół ICSAS (Informatics and Computational Safety Analysis Staff), będący częścią Centrum do spraw Oceny i Badań nad Lekami (CDER – Center for Drug Evaluation and Research) Amerykańskiej Agencji ds. Leków i Żywności (FDA) czy też laboratorium doświadczalne amerykańskiego Centrum Toksykologii Obliczeniowej (National Center for Computational

Wykorzystywane m.in. przez przemysł farmaceutyczny techniki komputerowej predykcji toksyczności można ogólnie podzielić na trzy kategorie – modelowanie molekularne, systemy ekspertowe oraz systemy oparte na danych.

Toxicology), działającego w ramach rządowej organizacji badającej i chroniącej środowisko (EPA – Environmental Protection Agency). Zespoły te we współpracy z firmami informatycznymi, farmaceutycznymi i chemicznymi opracowują toksykologiczne bazy danych, tworzą i oceniają techniki drażenia danych oraz techniki QSAR, dążąc do stworzenia zestawu narzędzi do oceny efektów (mutagenności, kancerogenności i in.) i dawek toksycznych.

Choć modelowanie i predykcja toksyczności w warunkach *in silico* nie jest jeszcze metodą rutynowo stosowaną podczas badań nad lekiem, to wyniki podobnych doświadczeń są już wykorzystywane np. przez amerykańską Agencję Ochrony Środowiska (EPA), Narodowy Instytut Zdrowia (NIH) czy instytucje rejestrujące leki podczas procesu decyzyjnego. Dane uzyskane w wyniku modelowania komputerowego są brane pod uwagę, gdy wyniki badań bezpieczeństwa leku nie są jednoznaczne, a także wtedy, gdy decyzja musi być podjęta w sytuacji braku wszystkich pożądaných informacji na temat bezpieczeństwa (produkty degradacji, metabolity, zanieczyszczenia). Wyniki modelowania w warunkach *in silico* dla strukturalnie podobnych związków i predykcja efektów toksycznych i klinicznych pozwalają również uniknąć dodatkowych cykli oceny leku.

Wybrane przykłady modeli predykcyjnych

Hepatotoksyczność

Retrospektywna analiza przyczyn niepowodzeń podczas badań nowych substancji rozwijanych jako przyszłe leki wyraźnie wskazuje, że działania toksyczne są coraz częstszym problemem. Najczęściej obserwowane podczas badań klinicznych efekty to hepato-, kardio- i neurotoksyczność, które są również głównymi przyczynami wycofywania z rynku już wdrożonych leków. Fakty te powodują, że zagadnienia związane ze skutecznym przewidywaniem i oceną wpływu toksycznego na wątrobę oraz ryzyka wywoływania niemiarowości pracy serca, pozostają kluczowymi dla przemysłu farmaceutycznego. Warto w tym miejscu przypomnieć, że zgodnie z danymi amerykańskimi drugą przyczyną sytuacji wymagających przeszczepów wątroby jest właśnie uszkodzenie spowodowane lekami (ang. *Drug-Induced Liver Injury* – DILI), wśród których wyróżnia się dwie klasy – działania zależne i niezależne od dawki, z których szczególnie trudne do przewidzenia są drugie – efekt idiosynkratyczny, w dużej mierze zależny od czynników genetycznych, a więc niezależny od dawki.

Podstawowy system oceny hepatotoksyczności – model oparty na skalowaniu wyników doświadczeń wykonywanych na zwierzętach – zawodzi. Szacuje się, że działanie toksyczne na wątrobę, jest elementem badań bezpieczeństwa leku najstabilniej skorelowanym z danymi o podobnym działaniu u ludzi, a dotyczy to

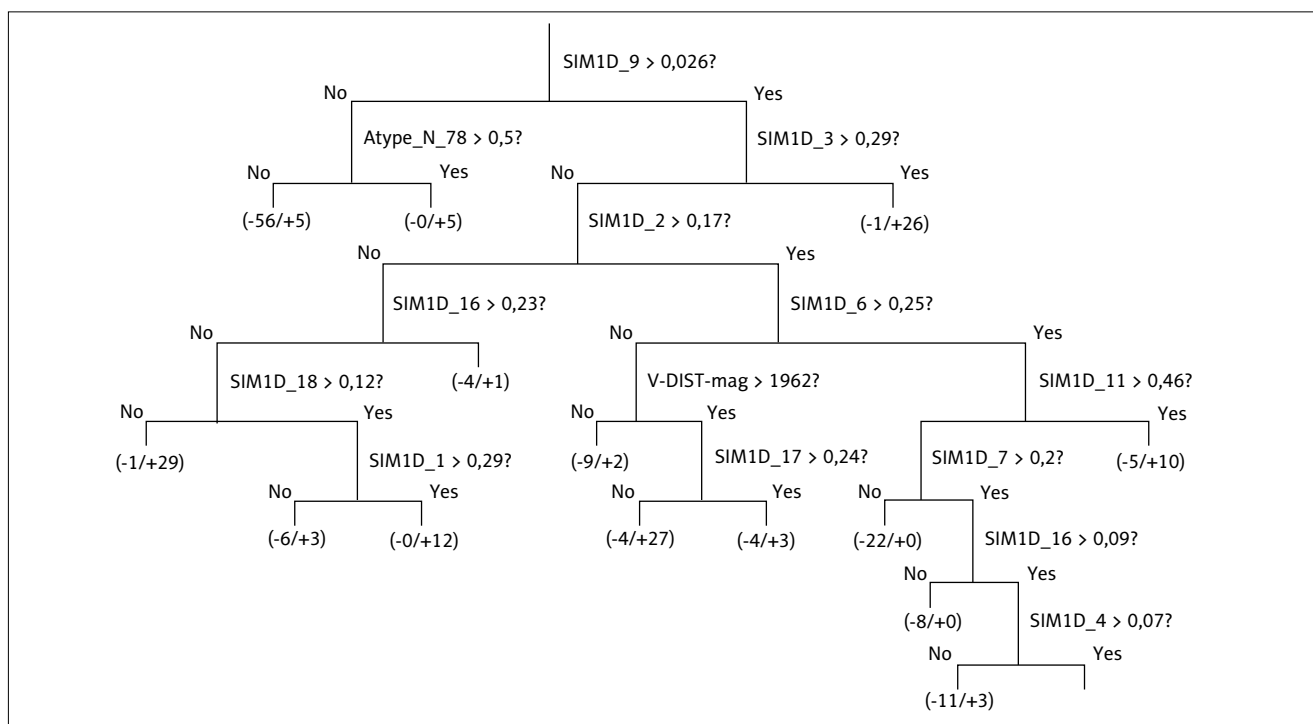
Tabela. Przykłady komputerowych systemów predykcyjnych dla różnych rodzajów toksyczności

Systemy oparte na danych	Przewidywany punkt końcowy	Dostępność
MCASE (CASE, CASETOX)	Działanie mutagenne, kancerogenne, drażniące, teratogenne, hepatotoksyczne, maksymalna dawka tolerowana, biodegradacja i inne	www.multicase.com
TOPKAT	Działanie mutagenne, kancerogenne, drażniące, skórne reakcje uczuleniowe, LD ₅₀ , toksyczność środowiskowa i inne	http://accelrys.com/products/discovery-studio/toxicology/
Lazar	Działanie mutagenne, kancerogenne, hepatotoksyczne, toksyczność środowiskowa	http://lazar.in-silico.de/
MDL QSAR	Działanie mutagenne, kancerogenne, inhibicja hERG, toksyczność ostra, LD ₅₀	www.mdli.com
ToxScope	Działanie mutagenne, kancerogenne, teratogenne, drażniące, hepatotoksyczne i inne	www.leadscope.com
COMPACT	Działanie kancerogenne i toksyczność związana z CYP450	
PASS	Różne	
Cerius	ADME, hepatotoksyczność	www.accelrys.com/cerius2/czadme.html
Tox boxes	M/AT/C/LD50 and more	http://pharma-algorithms.com/
MetaDrug	Ponad 40 modeli ADME-Tox	
DICAS	Działanie kancerogenne	
CADD	Toksyczność związana z CYP450 i receptorowa	
CSGenoTox	Działanie mutagenne	www.chemsilico.com
Admensa Interactive	Kardiotoksyczność	
PreADMET	Działanie mutagenne, karcinogenne	
Classical QSAR approaches	Różne	
ADMET Predictor	Działanie mutagenne, kancerogenne, drażniące, kardiotoksyczne, skórne reakcje uczuleniowe, LD ₅₀ , toksyczność środowiskowa, modulacja receptora estrogenowego i inne	www.simulationsplus.com

Systemy ekspertowe	Przewidywany punkt końcowy	Dostępność
DEREK for Windows	Działanie mutagenne, kancerogenne, drażniące, skórne reakcje uczuleniowe, i inne (ponad 40)	http://www.lhasalimited.org
Oncologic	Działanie karcinogenne	http://www.epa.gov/oppt/sf/
HazardExpert	Działanie mutagenne, kancerogenne, drażniące, immunotoksyczne, neurotoksyczne, skórne reakcje uczuleniowe	http://www.compudrug.com/
BfR Decision Support System	Działanie drażniące	

szczególnie reakcji idiosynkratycznych. Niezwykle trudne jest wymienienie wszystkich przyczyn tego faktu, jednak podstawowe wynikają oczywiście z różnic anatomicznych, fizjologicznych i funkcjonalnych między wątrobą ludzką i wątroбами zwierzęcymi.

Efektom tego jest bardzo intensywne poszukiwanie modelu realizowanego zarówno w warunkach *in*



Rycina 3. Przykład drzewa decyzyjnego

in vitro jak i *in silico*, pozwalającego na skuteczną, wydajną, a przy tym efektywną ekonomicznie ocenę hepatotoksyczności. Podstawowy element to zdefiniowanie punktu końcowego, a więc ocenianego efektu toksycznego. Idealna sytuacja to taka, w której efekt ten można kwantyfikować, a więc oceniać ilościowo lub przynajmniej półilościowo, a nie tylko jakościowo. Wśród ocenianych parametrów znajdują się:

- cytotoksyczność wieloczynnikowa (kombinacja wielu ocenianych czynników powodujących uszkodzenie komórki; wyniki uzyskiwane m.in. z wykorzystaniem cytometrii przepływowej i zmodyfikowanych wersji tej techniki),
- stłuszczenie komórki (ocena zawartości lipidów),
- cholestaza (obróć komórkowy kwasem taurocholowym),
- fosfolipidoza (kumulacja fosfolipidów w cytoplazmie komórki),
- ocena reaktywnych metabolitów (kompleksów GSH),
- stres oksydacyjny (ocena z wykorzystaniem barwników redoks),
- uszkodzenie mitochondriów (ocena integralności błony mitochondrialnej – metodą barwienia).

Parametry te są oceniane w sposób ilościowy z wykorzystaniem biomarkerów:

- ocena integralności błony komórkowej (ALT, AST, SDH, GDH, LDH, αGST),
- cholestaza (ALP, γGT)

Wskaźniki aktywności funkcjonalnej wątroby to m.in. bilirubina, kwasy tłuszczowe, wytwarzane w wątrobie elementy kaskady krzepnięcia, cholesterol, triglicerydy. Oprócz tego ocenia się aktywność

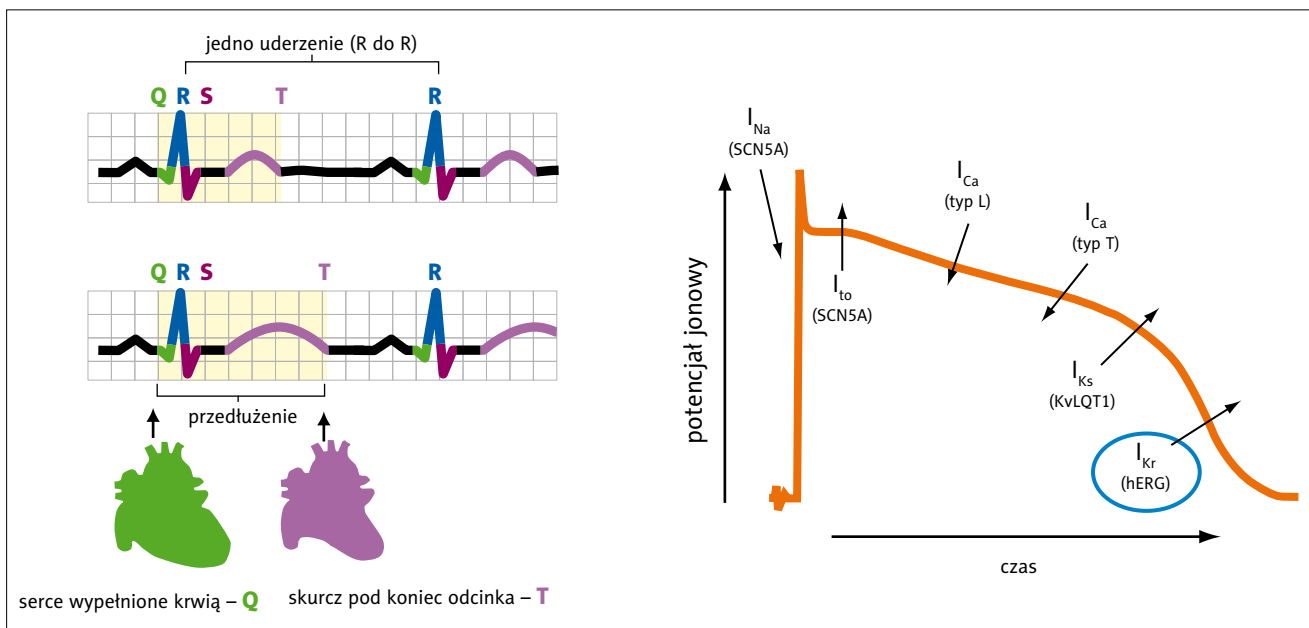
metaboliczną jako element procesu eliminacji ksenobiotyku (klirens).

Mimo oczywistych ograniczeń, związanych z koniecznością ekstrapolacji *in vitro-in vivo*, dostępne współcześnie modele *in vitro* pozwalają na coraz lepszą ocenę potencjalnej toksyczności. Najważniejsze z nich obejmują:

- ludzkie hepatocyty – system z wyboru do oceny hepatotoksyczności *in vitro*,
- ludzkie hepatocyty otrzymane z komórek pierwotnych,
- ludzkie hepatocyty otrzymane z embrionalnych komórek pierwotnych,
- komórki analogiczne do hepatocytów otrzymane z komórek szpiku,
- komórki analogiczne do hepatocytów otrzymane z innych tkanek (np. komórki nowotworowe trzustki),
- linie komórkowe, w tym modyfikowane genetycznie – systemy oparte najczęściej na komórkach nowotworowych hodowanych w warunkach laboratoryjnych (np. HepG2, HepaRG).

Podejmuje się także próby bardziej kompleksowego odwzorowywania w warunkach laboratoryjnych środowiska, jakim jest wątroba, ponieważ izolowane komórki nie są w stanie w pełni odtworzyć tak zaawansowanego systemu. Przykładem tego rodzaju podejścia mogą być proste systemy złożone (tzw. *sandwich culture*), czy też bardziej zaawansowane jak np. bioreaktory.

Ze względu na opisaną wyżej mnogość punktów końcowych, a więc możliwych elementów, które



Rycina 4. Graficzna prezentacja wydłużenia odcinka QT w zapisie EKG oraz jego manifestacja na poziomie kanałów jonowych

podlegają predykcji, zagadnienie matematycznego (chemiczno-matematycznego) modelowania hepatotoksyczności jest niezwykle skomplikowane. Nie oznacza to oczywiście, że takie działania nie są podejmowane; wprost przeciwnie, ze względu na poziom komplikacji problemu realizowane komputerowo algorytmy predykcyjne są tym bardziej pożądane. Jednym z przykładów systemów predykcji hepatotoksyczności w warunkach *in silico* jest model stworzony z wykorzystaniem wiodącego w tej kategorii oprogramowania – pakietu Accelrys [3]. Zbiór danych podzielono względem efektu hepatotoksycznego na dwie kategorie – toksyczne (toksyczność zależna od dawki) oraz uznawane za bezpieczne. Każda z blisko 400 substancji została opisana przez 25 deskryptorów (liczbowo wyrażonych informacji) definiujących strukturę dwuwymiarową (płaską). Deskryptory te zostały wybrane ze zbioru kilkuset dostępnych, obliczanych w jednym ze składników systemu Accelrys [4] – programie Cerius². Wykorzystany algorytm predykcyjny działa na podstawie tzw. drzew decyzyjnych, a więc systemów empirycznych (których podstawę stanowi doświadczenie badacza wyrażone w zebranych danych). Zastosowanie drzew decyzyjnych pozwoliło osiągnąć blisko 80% skuteczność systemu. Jak każdy z tego typu systemów, podobnie i ten ma swoje zalety i wady. Podstawową zaletą jest możliwość zminimalizowania liczby wykorzystywanych w trakcie badań przedklinicznych zwierząt laboratoryjnych oraz – związana z charakterem wybranego algorytmu – możliwość dokładnego prześledzenia „ścieżki logicznej”, a więc zbudowania zdroworozsądkowych, przyczynowo-skutkowych, zrozumiałych dla człowieka reguł, które mogą stanowić podstawę systemu ekspertowego. Przykład podobnej zależności

został przedstawiony na rycinie 3. Każde rozgałęzienie przedstawia regułę działającą na zasadzie „jeżeli – to”.

Idiosynkratyczna toksyczność leków, w tym hepatotoksyczność (kategoria DILI-2), jest szczególnie trudna do oceny i predykcji, a w warunkach klinicznych efekt ten często ujawnia się już po wprowadzeniu leku na rynek i zastosowaniu go w szerokiej, zróżnicowanej populacji. Niemniej jednak powstają skuteczne systemy *in silico*, pozwalające z dużym prawdopodobieństwem przewidzieć dla określonej substancji ryzyko jego wystąpienia w populacji. Bazując na bardziej zaawansowanych, wymagających większej mocy obliczeniowej oraz bardzo ścisłych założeniach początkowych deskryptorach, zespół portugalskich naukowców z Wydziału Farmaceutycznego w Porto opracował i przeprowadził wzajemne porównanie zestawu algorytmów zaliczanych do inteligencji obliczeniowej, wyspecjalizowanych w predykcji ryzyka wywoływania efektów hepatotoksycznych o charakterze idiosynkratycznym.

Zebrany zbiór informacji o lekach (33 molekule, dla których zanotowano reakcje idiosynkratyczne w warunkach *in vivo* oraz 41 substancji obojętnej) zawierał dane opisujące ich strukturę przestrzenną (klasa tzw. deskryptorów RDF – *Radial Distribution Function*). Wśród zastosowanych algorytmów modelowania wykorzystano m.in. sztuczne sieci neuronowe oraz drzewa decyzyjne. Najlepsze uzyskane modele prawidłowo przewidywały ryzyko idiosynkratycznej hepatotoksyczności z ponad 80% prawdopodobieństwem. Dodatkowo wyodrębniono również zbiór reguł bazujących na stosowanych deskryptorach pozwalający opisać zależności między strukturą chemiczną cząstki leku i ryzykiem hepatotoksyczności.

Kardiotoksyczność

Działania toksyczne leków w obrębie układu krążenia są obok hepatotoksyczności główną przyczyną niepowodzeń na etapie badań klinicznych oraz wycofywania leków z rynku lub poważnych ograniczeń ich zastosowania. Wielokształtny częstoskurcz komorowy typu torsad (TdP) jest potencjalnie zagrażającą życiu arytmia coraz częściej rozpoznawaną jako powikłanie farmakoterapii. Przypadki wystąpienia torsad są bardzo rzadkie, jednak możliwość ich pojawienia się nawet u młodych i zdrowych osób oraz wysokie ryzyko zgonu, które jest z nimi związane sprawia, że ryzyko działania proarytmicznego projektowanych leków jest szczególnie istotnym elementem oceny bezpieczeństwa w trakcie rozwoju leku oraz procesu rejestracji. Przyczyną arytmii TdP jest przede wszystkim wydłużenie odstępu QT w zapisie EKG (**rycina 4**).

Wydłużenie to może być uwarunkowane genetycznie (wrodzony zespół LQTS), bądź spowodowane przez czynniki egzogenne, w tym leki. Stwierdzono, że głównym mechanizmem prowadzącym do wydłużenia odstępu QT dla wszystkich leków, dla których odnotowano przypadki TdP jest hamowanie szybkiego odkomórkowego prądu potasowego odpowiedzialnego za późną fazę repolaryzacji. Kanał błonowy dla jonów potasowych kodowany jest przez gen hERG (ang. *human Ether-a-go-go related gene*). Najczęściej stosowanym markerem działania proarytmicznego jest zdolność leku do blokowania kanału potasowego hERG. Ryzyko powodowania arytmii szacowane jest na podstawie stężenia leku powodującego zmniejszenie amplitudy prądu hERG o połowę (IC₅₀). Im mniejsza wartość IC₅₀ dla danego leku tym większe ryzyko wydłużenia odstępu QT i arytmii. Metody szacowania IC₅₀ w warunkach *in vitro* obejmują badania przepływu rubidu, wypierania radioaktywnych ligandów z wiązania z receptorem, pomiary fluorescencji oraz pomiary elektrofizjologiczne, które wyznaczają obecnie „złoty standard” w badaniach potencjału proarytmicznego potencjalnych leków. Wszystkie te metody mają jednak liczne ograniczenia, limitujące możliwości ich zastosowania we wczesnych etapach badań. Są one związane między innymi z niską wydajnością i wysokimi kosztami wynikającymi głównie z konieczności stosowania systemów *in vitro*. Stąd wynika rosnące w ostatnim czasie zainteresowanie metodami *in silico* oferującymi możliwość skryningu znacznie większej liczby cząstek w relatywnie krótkim czasie, a także możliwość testowania cząstek wirtualnych, jeszcze niezsyntetyzowanych. W ostatnim czasie publikuje się coraz więcej artykułów opisujących modele tworzone w celu przewidywania potencjalnego działania proarytmicznego cząstek leków. Systemy predykcji obejmują wiele technik modelowania

matematycznego, które ogólnie podzielić można na trzy kategorie:

- **modelowanie homologiczne** – procedura projektowania porównawczego, w której wyniku na podstawie podobnych białek tworzony jest trójwymiarowy model badanej proteiny;
- **modele QSAR** – poszukiwanie zależności między aktywnością biologiczną a zbiorem cech opisujących właściwości i strukturę cząstek;
- **metody klasyfikacyjne** – techniki podziału zbioru cząstek na klasy lub kategorie tego samego typu; Jeden z pierwszych opisów modeli klasyfikacyjnych został opublikowany przez Roche i wsp. w 2002 roku. Dane zastosowane do budowy modelu uzyskano doświadczalnie za pomocą standardowej techniki Patch Clamp, ponadto dla każdej cząstki obliczono ponad 1250 deskryptorów fizykochemicznych i strukturalnych. Zbiór wartości IC₅₀ uzyskanych dla 244 cząstek został podzielony na dwa podzbiory – zawierający cząstki o niskiej (<1 μM) i wysokiej (>10 μM) wartości IC₅₀. Do stworzenia modeli użyto takich technik, jak analiza podstruktur, samoorganizujące się mapy, metody cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS), analiza składowych głównych oraz sztuczne sieci neuronowe. Największą trafność predykcji wykazywał model uzyskany z wykorzystaniem sztucznych sieci neuronowych. Weryfikację systemu przeprowadzono przy użyciu zbioru walidacyjnego złożonego z 95 substancji (57 wartości IC₅₀ z własnych oznaczeń i 38 wyszukanych w dostępnym piśmiennictwie naukowym). System prawidłowo klasyfikował 93% substancji nieblokujących kanału hERG i 71% blokerów.

Otrzymano: 2009.03.08 · Zaakceptowano: 2009.03.25

Piśmiennictwo

1. Wiśniowska B., Polak S.: Modelowanie komputerowe w badaniach nad lekiem – projektowanie i poszukiwanie cząstki aktywnej, ocean właściwości fizykochemicznych oraz aktywności biologicznej. *Farm. Pol.* 2009, 65 (3), 214–222.
2. Olsoni i wsp.: Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2000, 32 (1): 56–67.
3. Tarkan, L.: F.D.A. increases efforts to avert drug-induced liver damage. *New York Times*, Aug. 14, 2001.
4. Cheng, A., Dixon S.L.: *In silico* models for the prediction of dose-dependent human hepatotoxicity. *J. Comp.-Aided Mol. Des* 2003, 17, 811–823.
5. www.accelrys.com
6. www.fda.gov
7. www.emea.europa.eu
8. www.epa.gov/ncct/
9. Cruz-Monteagudo, M. i wsp.: Computational Chemistry Approach for the Early Detection of Drug-Induced Idiosyncratic Liver Toxicity. *J. Comput. Chem.* 2008, 29, 533–549.
10. Roche O., Trube G., Zuegge J. i wsp.: A virtual screening method for prediction of the hERG potassium channel liability of compound libraries. *Chem. Bio. Chem.* 2002, 3 (5), 455–459.
11. Kola, I., Landis, J.: Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery* 2004, 3 (8), 711–715.
12. Malik, M., Camm, A.J.: Evaluation of drug-induced QT interval prolongation: Implications for drug approval and labeling. *Drug Safety* 2001, 24 (5), 323–351.