

Modelowanie komputerowe w badaniach nad lekiem. Ekstrapolacja *in vitro* – *in vivo* – symulacja badań klinicznych

Sebastian Polak, Barbara Wiśniowska

Pracownia Farmakoepidemiologii i Farmakoekonomiki, Wydział Farmaceutyczny UJ CM, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków

Adres do korespondencji: Pracownia Farmakoepidemiologii i Farmakoekonomiki, Wydział Farmaceutyczny UJ CM, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, e-mail: spolak@cm-uj.krakow.pl

Computer modeling in drug research. *In vitro-in vivo* extrapolation – clinical trials simulation · Clinical trials necessary for the drug approval are the most expensive stage of drug discovery and development process. At the same time drug candidate face the highest probability of failure, mainly due to insufficient safety profile, and the research discontinuation necessity occurs. Therefore there is much interest in methods which can support and guide clinical studies in humans and exclude the chance of the extreme observations findings. Computational modeling and simulation systems use for the automatic *in vitro* – *in vivo* extrapolation and clinical trials simulations have been recognized as useful and valuable tools superior in comparison with animal models as they enable to assess the variability in drug behaviour and human organism reaction. This paper summarizes whole series about mathematical modeling applications in pharmacy, especially in drug discovery and development. The paper also presents individual models as well as specialized platforms for advanced toxicological assessments, physico-chemical parameters and pharmacokinetic profiles predictions and very briefly their usage in PK-PD modeling.

Keywords: IVIVE, clinical trials, modeling.

© Farm Pol, 2010, 66(1): 68-75

Wstęp

Najbardziej kosztownymi etapami badań nad lekiem są badania kliniczne. Konieczność zaangażowania odpowiednich, spełniających kryteria włączenia do badania, zdrowych ochotników lub osób chorych odpowiednio dla poszczególnych faz badań, ich zaplanowanie, zaangażowanie wyspecjalizowanego personelu, ośrodka monitorującego i samych monitorów badań klinicznych, a w końcu wdrożenie odpowiednich technik analitycznych, wymagają nakładów przekraczających możliwości finansowe większości

firm farmaceutycznych świata. Jeśli do wymienionych składowych doliczymy, w ostatnich latach kształtujące się na wysokim poziomie, prawdopodobieństwo konieczności przerwania dalszych badań, związanych najczęściej z niekorzystnym profilem bezpieczeństwa leku i związane z tym koszty, na rynku pozostaje jedynie kilka, maksymalnie kilkanaście podmiotów będących w stanie podjąć podobnym wyzwaniom.

Naturalnym jest więc poszukiwanie metod, które pozwoliłyby zwiększyć prawdopodobieństwo oceny potencjalnych sytuacji problematycznych, które mogą pojawić się w trakcie badań klinicznych, a więc najbardziej wymagających jeśli chodzi o bezpieczeństwo, ponieważ przeprowadzanych w warunkach *in vivo* na ludziach. Narzędzia komputerowego modelowania i symulacji, a w zasadzie automatycznego skalowania już wcześniej otrzymanych w laboratoriach wyników (zasymulowanych w warunkach *in silico*, otrzymanych na szczepach i hodowlach komórkowych w warunkach *in vitro* czy też *in vivo* na zwierzętach) na warunki *in vivo* u ludzi są bardzo cenne. Jedną ze szczególnie cennych charakterystyk niektórych z dostępnych systemów, jest możliwość przewidywania wpływu zróżnicowania międzyosobniczego na losy leku w organizmie. Nie mamy więc już do czynienia z „panem Kowalskim”, reprezentującym przeciętnego osobnika, a symulujemy GRUPĘ ludzi (populację), zróżnicowanych pod kątem demograficznym, fizjologicznym (patofizjologicznym w przypadku populacji osób chorych) czy nawet genetycznym [1]. Warte podkreślenia jest, że tak ostatnio popularna – nawet mimo braku, jak na razie, szerokiego zastosowania praktycznego – dziedzina jaką jest farmakogenetyka, a więc możliwość oceny i wykorzystania profilu genetycznego każdego z pacjentów w dostosowaniu kuracji lekowej i jej optymalizacji

pod kątem skuteczności i bezpieczeństwa, wchodzi do powszechnego użycia niejako kuchennymi drzwiami, jako element platformy symulującej badania kliniczne. Choć symulacje komputerowe nie są w stanie rozwiązać wszystkich napotykaných problemów, to jednak umożliwiając przeprowadzanie wirtualnych doświadczeń pozwalają na podstawie przesłanek dojść do konkluzji („jeżeli – to”), a w niektórych przypadkach nawet ułatwiać wyjaśnienie mechanizmów reakcji zachodzących w organizmie.

W artykule podsumowującym cały cykl opisujący zastosowanie technik modelowania matematycznego, przedstawione zostaną założenia koncepcyjne podobnych systemów, przykłady pojedynczych modeli oraz całych platform, będących zaawansowanymi, kompleksowymi zbiorami algorytmów. Systemy takie znajdują zastosowanie w zaawansowanej ocenie toksyczności dla wybranych narządów, predykcji parametrów oraz profili farmakokinetycznych i ich wykorzystania do modelowania PK-PD (zależności farmakokinetyczno-farmakodynamicznych). Dla każdego z nich postaramy się opisać co najmniej jeden przykład praktycznego wykorzystania w trakcie badań nad lekiem.

Założenia działania dostępnych systemów

Podobnie jak niemal wszystkie systemy wykorzystywane do symulacji prowadzonych w warunkach *in silico*, tak i symulatory zachowania leku w warunkach *in vivo* wymagają pewnych informacji początkowych, które stanowią podstawę dla dalszych prac. O ile najczęściej i intuicyjnie przyjmuje się, że częścią determinującą zachowanie symulatora jest algorytm jego działania, a więc mówiąc w dużym uproszczeniu – wzór matematyczny, według którego działa – o tyle pamiętać trzeba, że informacje, które wprowadzamy przed rozpoczęciem symulacji mają co najmniej tak samo duże znaczenie. Algorytmicznie podobne systemy mają niemal zawsze charakter mechanistyczny, co oznacza, że równania matematyczne opisują pewne zjawiska fizjologiczne, zaobserwowane wcześniej w trakcie badań *in vitro* lub *in vivo* z udziałem ludzi. Bazując na zbudowanych relacjach i wykorzystując wybrane, uznane za istotne parametry, tworzone są reguły zapisywane w postaci równań matematycznych. Umożliwia to ocenę wpływu tych czynników na analizowaną, interesującą nas wielkość. Przykładem może być zjawisko dyfuzji, które spotykamy m.in. w trakcie przenikania substancji aktywnych z krwi do tkanek i komórek. Powszechnie wykorzystywane są prawa Ficka (pierwsze – dla przestrzeni jednowymiarowej i drugie – kiedy chcemy śledzić nie tylko zmiany stężenia substancji w poszczególnych miejscach, ale także w czasie).

Podobnie w przypadku predykcji enzymatycznych przemian leków wykorzystywane jest doskonale

znane równanie Michaelisa-Menten (**równanie 1**), opisujące zależność między stężeniem substratu i szybkością reakcji.

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

gdzie:

v – szybkość reakcji enzymatycznej

V_{\max} – maksymalna szybkość reakcji enzymatycznej

K_m – stała Michaelisa

$[S]$ – stężenie substratu reakcji

W przypadku platform symulujących zachowanie leku w organizmie ludzkim najczęściej wykorzystywane są informacje z badań laboratoryjnych *in vitro*, głównie z wykorzystaniem hodowli komórkowych, wybranych organelli komórek lub ich elementów funkcjonalnych. Zmiany w sposobie podejścia do prac nad lekiem od momentu wprowadzenia i po okresie uwiarygodnienia się metod opartych na hodowlach komórkowych są trudne do przecenienia. Jest to ważne zarówno ze względów naukowych i praktycznych, jak choćby możliwość wstępnej oceny kardiotoxyczności na linii komórkowej HEK293 opisana w poprzedniej części, jak i z przyczyn etycznych – redukcja ilości poświęcanych zwierząt laboratoryjnych. W tym miejscu warto również przypomnieć problem skalowania allometrycznego, a więc przenoszenia obserwacji i wniosków uzyskanych w badaniach na zwierzętach bezpośrednio na ludzi. W większości typów opisywanego oprogramowania tego typu operacje nie są wykonywane (choć są wyjątki), głównie ze względu na wciąż nieistniejące sprawdzone i powtarzalne algorytmy, które by to umożliwiły. Będziemy więc bazować na danych z badań *in vitro* oraz *in vivo* angażujących ludzi.

Czysto akademicki, choć przydatny i czytelny podział na typy niektórych z wykorzystywanych informacji, a bazujący na źródłach danych, mógłby wyglądać w sposób podany poniżej. Jednocześnie podano przykłady poszczególnych kategorii i zaznaczono, w jakim celu mogą być one następnie wykorzystywane.

A. WYNIKI DOŚWIADCZEŃ *IN VITRO*

A1 – bez angażowania hodowli tkankowych/komórkowych

- współczynnik podziału olej-woda (logP, logD) → WCHŁANIANIE, BIODOSTĘPNOŚĆ, DYSTRYBUCJA, METABOLIZM, WYDALANIE
- stała dysocjacji (pKa) – WCHŁANIANIE, BIODOSTĘPNOŚĆ, DYSTRYBUCJA, METABOLIZM, WYDALANIE
- rozpuszczalność właściwa → WCHŁANIANIE, BIODOSTĘPNOŚĆ
- rozpuszczalność w różnych mediach (pH, kwasy żółciowe) → WCHŁANIANIE, BIODOSTĘPNOŚĆ
- parametry rozpuszczania/uwalniania substancji ze stałych postaci leku → stała szybkości

- uwalniania, grubość bariery dyfuzyjnej (heff) → WCHŁANIANIE, BIODOSTĘPNOŚĆ
 - wiązanie leku z białkami osocza → DYSTRYBUCJA
 - wiązanie leku z czerwonymi ciałkami krwi → DYSTRYBUCJA
- A2 – z wykorzystaniem hodowli tkankowych/komórkowych lub organelli/elementów funkcjonalnych
- metabolizm – ludzkie hepatocyty, mikrosomy lub rekombinowane enzymy → METABOLIZM NARZĄDOWY
 - blokowanie kanałów jonowych (np. kanałów potasowych hERG) – komórki HEK293 (linia ludzkich embrionalnych komórek nerkowych), CHO (komórki jajnika chomika chińskiego), XO (oocyty żab z rodzaju *Xenopus*) → KARDIOTOKSYCZNOŚĆ
 - przenikanie przez bariery błonowe (jelita, krew-mózg, płuca) – MDCK (psie komórki nerkowe), LLCPK (świńskie komórki nowotworowe nerek), Caco-2 (ludzkie komórki nowotworowe okrężnicy), Calu-3 (ludzkie komórki nowotworowe oskrzeli) → WCHŁANIANIE, BIODOSTĘPNOŚĆ, METABOLIZM
 - HaCaT (ludzkie keratinocyty) → WCHŁANIANIE TRANSDERMALNE, DYSTRYBUCJA

B. WYNIKI DOŚWIADCZEŃ *IN VIVO* I/LUB BADAŃ DEMOGRAFICZNYCH

- B1 – masa wątroby
- B2 – wzrost/masa ciała/płec
- B3 – zawartość i rozkład w populacji enzymów metabolizujących leki w poszczególnych narządach (CYP/UGT – nerki, jelita, wątroba)
- B4 – aktywność enzymatyczna poszczególnych klas enzymów (najczęściej z rodziny cytochromu P450 i UGT)
- B5 – zawartość białek wiążących leki we krwi (albuminy, glikoproteiny)

Ilość danych zebranych dla poszczególnych działań zależy w dużym stopniu od dostępności metod i technik badawczych oraz materiałów (w tym materiału biologicznego), stopnia komplikacji czy też w końcu popularności naukowej danego zagadnienia. Wszystkie z wymienionych aspektów mają wyraźne odbicie w ilości publikacji naukowych, będących głównym źródłem informacji wykorzystywanych do budowy podobnych baz danych. Pierwszy z wymienionych czynników ma szczególne znaczenie w przypadku dostępności i jakości materiału biologicznego. Jest to związane m.in. z ostrymi wymogami dotyczącymi sposobu przeprowadzania doświadczeń z wykorzystaniem materiału pochodzącego od ludzi, co jest podparte regulacjami zarówno unijnymi, jak i obowiązującymi w innych rozwiniętych krajach, niebędących członkami UE. Nie jest to jednak jedyny czynnik – jakość materiału również ma zasadnicze znaczenie.

Przykładem może być ocena zawartości (ang. *abundance*) enzymów poszczególnych cytochromów z rodziny P450 w jelitach. Wydawać by się mogło, że pobranie materiału (biopsja w trakcie gastroskopii) i jego zbadanie nie jest skomplikowane, a jednak istnieją jedynie 2 publikacje, których autorzy pokusili o podobną ocenę [3, 4]. Przyczyną jest zarówno różnorodność technik pobierania materiału (zdrapywanie, biopsja), jak i ocena ilościowa (wśród dostępnych technik m.in. western blotting) znacznie utrudniająca analizę i ujednoczenie uzyskanych danych w taki sposób, aby możliwe było ich wykorzystanie do budowy wiarygodnego modelu. Powstaje również pytanie, z którego odcinka jelita cienkiego należy pobrać próbkę (dwunastnica, jelito czcze, jelito kręte) i czy należy oczekiwać różnych wartości dla zawartości i aktywności enzymów w komórkach ściany jelit (enterocyty). Niemniej jak już wspomniano, podobne próby są czynione, a uzyskane dane można wykorzystać jako element „wirtualnego człowieka”. Należy pamiętać o tym, że niektóre z parametrów są skorelowane, a więc zależą wzajemnie od siebie. Przykładem może być masa wątroby, która będzie ważnym skalarem, umożliwiającym odniesienie wyników uzyskiwanych w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem ludzkich hepatocytów na warunki *in vivo*. W dużych badaniach stwierdzono silną zależność pomiędzy masą wątroby a wiekiem, stąd właśnie w wirtualnej populacji wiek jest wykorzystywany do obliczania masy wątroby u każdego osobnika. Jeśli połączymy razem dziesiątki innych parametrów opisujących interesujące nas zmienne, jesteśmy w stanie stworzyć realizowanego *in silico* wirtualnego uczestnika badań klinicznych. Dołączając do tego zmienność międzyosobniczą, którą można obserwować w populacji i wewnątrzosobniczą (np. różna grubość skóry dla różnych miejsc podania leku stosowanego na skórę), można pokusić się o symulowanie całych populacji. Przykładowa ścieżka wykorzystywana do tworzenia wirtualnego pacjenta pokazana jest na **rycynie 1**.

Grafika ta jest jedynie drobnym elementem dużo większego zbioru danych wykorzystywanego w tym celu. Jednym z głównych elementów badań klinicznych, a więc także tych symulowanych komputerowo, jest ocena wpływu zmienności międzyosobniczej na obserwowane efekty i parametry – farmakokinetyczne i farmakodynamiczne, a więc m.in. selekcja pacjentów mogących osiągać wartości skrajne – to stwierdzenie pojawiało się już w tym artykule i zapewne jeszcze będziemy to podkreślać. Nieraz jest to związane z poważnymi konsekwencjami – przekroczeniem stężeń maksymalnych, wzrostem ryzyka działania toksycznego, choć z drugiej strony może to również oznaczać nieosiągnięcie poziomu leku umożliwiającego wywołanie pożądanego efektu i jego nieskuteczność z dotychczasowymi dodatkowymi zjawiskami (lekooporność). W odpowiednio

zaprojektowanych symulacjach w wielu przypadkach możemy to ocenić odpowiednio wcześniej, nie ryzykując zdrowia pacjentów i ochotników.

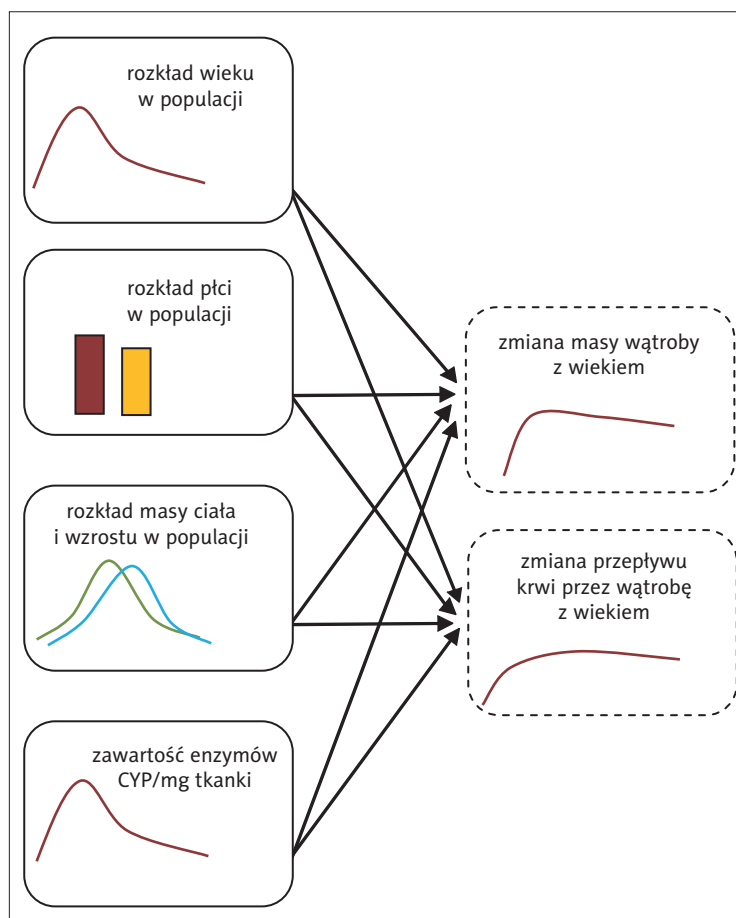
Przygotowanie podobnych baz danych, wybór lub stworzenie własnych modeli (równań) matematycznych i ich wdrożenie to lata pracy zespołów naukowców. Dlatego właśnie, mimo pozornej prostoty tego rozwiązania, jego realizacja jest możliwa jedynie w silnych grupach naukowych.

Przebieg symulacji

Niezbędne dane

Zakres informacji niezbędnych do przeprowadzenia symulacji zależy od oczekiwanego rezultatu – to cel przeprowadzania podobnych doświadczeń warunkuje typ danych wprowadzanych do systemu. Najbardziej ogólnie możemy podzielić je na dwie grupy:

- a) informacje dotyczące populacji – pozwalają stworzyć w pamięci komputera wirtualne populacje o różnej liczebności, strukturze i charakterystyce (zdrowi ochotnicy, populacja kaukaska, populacja japońska, populacja osób chorych na wybrane choroby); zakładając, że charakterystyka niezbędnych parametrów (ich zmienność w populacji) została wcześniej przygotowana wybieramy losowo określoną liczbę uczestników badania wraz z możliwością wielokrotnego powtarzania symulacji na różnej grupie ludzi (np. 10 razy 100 osobowa populacja), co pozwala oszacować zmienność i wykryć osobniki posiadające skrajne wartości niektórych zasadniczych parametrów wpływających na zachowanie leku w organizmie (poziom i aktywność enzymów, masa wątroby itp.);
- b) informacje dotyczące substancji chemicznej (leku) oraz postaci leku – to właśnie w tym przypadku cel symulacji warunkuje zakres niezbędnych danych; łatwo to sobie wyobrazić na przykładzie symulacji interakcji lekowych przebiegających na poziomie enzymatycznym (kompetycyjne lub niekompetycyjne blokowanie miejsca aktywnego enzymu), gdzie, aby móc prześledzić zmiany na poziomie pojedynczego izoenzymu, konieczna jest charakterystyka zachowania danej substancji w warunkach *in vitro*, niezbędne dane obejmują więc oszacowane z zastosowaniem rekombinowanych izoenzymów lub ludzkich mikrosomów wątrobowych parametry opisujące kinetykę przemian enzymatycznych będące elementem równania Michaelisa-Menten (wartości V_{max} – maksymalna szybkość reakcji oraz K_m – takie stężenie substratu, przy którym szybkość reakcji enzymatycznej jest równa połowie szybkości maksymalnej V_{max}) oraz wartości określające liczbowo inhibicję enzymu (stała inhibicji K_i). Dołączając do powyższych informacji dane dotyczące populacji (zawartość enzymów na gram



Rycina 1. Przykład wykorzystania danych demograficznych i fizjologicznych w symulacji badań klinicznych

wątroby lub jedną komórkę wątrobową, masa wątroby, szybkość odtwarzania się enzymów, objętość krwi, hematokryt, zawartość i typ białek wiążących lek w osoczu itd.) symulujemy zmiany stężenia leku we krwi pełnej lub osoczu i wpływ jednoczesnego podania inhibitora na zmiany stężenia. Ogólny podział przygotowywanych przez użytkownika informacji obejmuje:

- podstawowe właściwości fizyko-chemiczne cząsteczki (masa molowa, $\log P$ – współczynnik podziału olej/woda, pK_a – stałe dysocjacji);
- informacje umożliwiające ocenę wchłaniania leku – rozpuszczalność, wiązanie z kwasami żółciowymi, współczynniki podziału, zachowanie postaci leku (np. wartość pH , przy którym z tabletki/kapsułki uwalniana jest substancja czynna); w przypadku stwierdzonego powinowactwa badanej substancji do białek transportujących (w jelitach, wątrobie) konieczne jest określenie wpływu transporterów na wchłanianie w jelitach (głównie poprzez P-glikoproteinę i wyrzucanie ksenobiotyków z enterocytów do światła jelita) oraz podobnych struktur w wątrobie wpływających na proces krążenia wątrobowo-jelitowego leków;

- opisane powyżej informacje dotyczące eliminacji leku i interakcji na poziomie enzymatycznym – w przypadku interakcji niekompetycyjnej (ang. MBI – *mechanism based inhibition*) dodatkowym parametrem oznaczanym w warunkach *in vitro* jest stała szybkości inaktywacji, a więc informacja o szybkości unieczynniania enzymu przez daną substancję chemiczną; nerki są jednym z głównych narządów biorących udział w wydalaniu leków i metabolitów (w mniejszym stopniu bezpośrednio w metabolizmie – głównie za sprawą enzymów II fazy) stąd ocena roli nerek dla naszego wirtualnego pacjenta wymaga podania informacji nt. filtracji kłębuszkowej oraz połączenia ich z przepływem krwi przez narząd;
- opis dystrybucji leku w organizmie może zostać przeprowadzony przy założeniu stanu stacjonarnego i podaniu lub obliczeniu z wykorzystaniem prostych modeli QSAR jednej wartości (Vd lub Vss) albo z wykorzystaniem bardziej zaawansowanych modeli umożliwiających ocenę zmian stężenia leku w poszczególnych tkankach i narządach organizmu (ang. PBPK – *physiologically-based pharmacokinetic modelling*) do czego potrzebne są oznaczone lub obliczone współczynniki podziału między osoczem i tkanką.

Platforma Simcyp jest tworzona przez zarejestrowaną w Wielkiej Brytanii firmę Simcyp Limited. Firma ma charakter ściśle naukowy, co potwierdza jej status – jest to tzw. „*spin-off company*”, a więc jej współtwórcą i współwłaścicielem jest uniwersytet (w tym przypadku University of Sheffield w Wielkiej Brytanii). Dziesięć lat temu dwaj profesorowie uniwersyteccy postanowili skomercjalizować swój dorobek naukowy, obejmujący matematyczne modelowanie interakcji leków na poziomie enzymatycznym, jego praktyczne zastosowania oraz dotychczasowe kontakty z innowacyjnym przemysłem farmaceutycznym. Efektem tego jest platforma ekstrapolacji *in vitro-in vivo* procesów ADME, która stanowi obecnie standard i wyznacznik postępu naukowego w tej dziedzinie.

Praca systemu

Pierwszym krokiem jest ustalenie wspomnianych powyżej wartości początkowych, z których korzysta system w trakcie swojej pracy, a których zakres zależy od postawionego na początku problemu do rozwiązania. Wybór interesującej nas populacji determinuje jej parametry, które będą różne dla populacji ludzi chorych na wybraną chorobę, zdrowych ochotników, kaukaskiej populacji ogólnej, populacji azjatyckiej. Każdy z wirtualnych uczestników badania symulowany jest indywidualnie, a opisujące go parametry dobierane są automatycznie. Bazując na naszych wirtualnych pacjentach, oceniamy zmiany stężenia substancji leczniczej i jej metabolitów „podanych” wybraną drogą – doustnie, we wlewie, wziewnie, transdermalnie itd. oraz zmiany wybranych parametrów fizjologicznych (np. poziom aktywności enzymów metabolizujących leki). Jeśli oceniamy wpływ potencjalnych interakcji lekowych – nasi wirtualni pacjenci przyjmują jednocześnie

kombinację leków. Możliwe jest symulowanie i porównanie dowolnych sytuacji bardziej lub mniej prawdopodobnych w warunkach klinicznych.

Oprogramowanie

SIMCYP

Platforma Simcyp [5] jest tworzona przez zarejestrowaną w Wielkiej Brytanii firmę Simcyp Limited. Firma ma charakter ściśle naukowy, co potwierdza jej status – jest to tzw. „*spin-off company*”, a więc jej współtwórcą i współwłaścicielem jest uniwersytet (w tym przypadku University of Sheffield w Wielkiej Brytanii). Dziesięć lat temu dwaj profesorowie uniwersyteccy postanowili skomercjalizować swój dorobek naukowy, obejmujący matematyczne modelowanie interakcji leków na poziomie enzymatycznym, jego praktyczne zastosowania oraz dotychczasowe kontakty z innowacyjnym przemysłem farmaceutycznym. Efektem tego jest platforma ekstrapolacji *in vitro-in vivo* procesów ADME, która stanowi obecnie standard i wyznacznik postępu naukowego w tej dziedzinie, a najważniejszą, wyróżniającą wśród innych tego typu systemów cechą, jest możliwość symulacji populacji ludzi i oceny zmienności międzyosobniczej o różnym źródle – demografia, genetyka i inne. Zespół ponad dwudziestu naukowców zarówno tworzy własne modele dla poszczególnych problemów, jak i implementuje najlepsze dostępne w literaturze naukowe.

Simcyp jako jedyny oferuje system ekstrapolacji dla populacji pediatrycznej – SimcypPaediatric – wyspecjalizowany odpowiednik głównego systemu, co ze względu na szczególną wrażliwość i wymogi dotyczące badań klinicznych z udziałem dzieci jest szczególnie cenne. Jego zastosowanie pozwala ukierunkować badania, ocenić elementy wrażliwe i zminimalizować liczbę zaangażowanych do badań dzieci.

Kolejnym elementem jest symulator procesów ADME u najczęściej stosowanych w laboratoriach badawczych zwierząt doświadczalnych – szczurów. Moduł SimRat pozwala zminimalizować liczbę poświęconych w trakcie badań zwierząt.

GastroPlus

Jest elementem większej grupy programów naukowych tworzonych przez amerykańską firmę SimulationsPlus [6]. Najważniejszą jego częścią jest moduł predykcji wchłaniania leków w przewodzie pokarmowym po podaniu doustnym w oparciu o dane uzyskane w doświadczeniach *in vitro*. Pozostałe elementy to ADMETpredictor (obliczanie właściwości fizykochemicznych molekuł oraz predykcja parametrów określających toksyczność *in vitro*), ClassPharmer (wizualizacja danych chemicznych), DDDPlus (symulacja uwalniania substancji aktywnej z doustnej postaci leku).

PKSim

Jest nietypowym przykładem podobnego oprogramowania ze względu na twórców systemu. W tym przypadku jest to niemiecki potentat farmaceutyczny – firma Bayer [7], co ogranicza zarówno zakres jego odbiorców, jak i charakter ścieżki rozwoju. Niemniej jest to oprogramowanie o podobnych zasadach działania i celach stosowania, jak platformy przedstawione powyżej.

Przykłady zastosowań

Farmakokinetyka – ADME

Jednym z najbardziej wnikliwie badanych elementów profilu farmakokinetycznego nowo wdrażanego leku jest potencjał wchodzenia w interakcje lekowe z innymi powszechnie stosowanymi substancjami. Szczególnym zainteresowaniem objęty jest izoenzym cytochromu P450 – CYP 3A4, ze względu na liczbę substancji stosowanych jako leki, metabolizowanych z jego udziałem. W badaniu opisanym w British Journal of Clinical Pharmacology [2] naukowcy z laboratoriów największego producenta leków na świecie, firmy Pfizer wykorzystali metody symulacji komputerowej do oceny klinicznego znaczenia interakcji marawiroku, niedawno zarejestrowanego leku wykorzystywanego do leczenia infekcji wirusem HIV (bloker receptorów dla chemokiny CCR5). Marawirok najczęściej podawany jest w terapii skojarzonej z ritonawirem, sakwinawirem, atazanwirem czy ketokonazolem – bardzo często stosowanym w infekcji wirusem HIV i w AIDS lekiem przeciwgrzybiczym, który jest silnym inhibitorem cytochromu 3A4. Bazując na danych uzyskanych w trakcie doświadczeń *in vitro* w warunkach laboratoryjnych, dokonano ekstrapolacji na warunki *in vivo* u ludzi wykorzystując platformę Simcyp. Całość włączonych informacji dla wszystkich leków obejmowała:

- masę molową,
- współczynnik podziału olej-woda – logP,
- współczynnik dysocjacji – pKa,
- współczynnik podziału krew/osocze – B/P,
- wiązanie leku z białkami osocza – fu (frakcja niezwiązana),
- % podanej doustnie dawki leku osiągającej krążenie ogólne (biodostępność) – Fa,

- stała szybkości wchłaniania – ka,
- objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym – V_{ss} ,
- klirens (szybkość ‘oczyszczania’) dla wybranego modelu *in vitro* – CL_{int} ,
- wiązanie leku z białkami w doświadczeniu *in vitro* – $f_{u,mic}$,
- klirens nerkowy – CL_R oraz
- dla inhibitorów enzymatycznych – stałe inhibicji dla reakcji odwracalnych i nieodwracalnych – K_i, k_{inact} .

Obserwowanymi parametrami były najczęściej wykorzystywane wskaźniki oceny nasilenia interakcji – zmiany maksymalnego stężenia leku w osoczu (C_{max}) oraz pola powierzchni pod krzywą stężenie-czas (ang. AUC – *area under the curve*). Wyniki symulacji zostały porównane z przeprowadzonym wcześniej badaniem klinicznym (**tabela 1**).

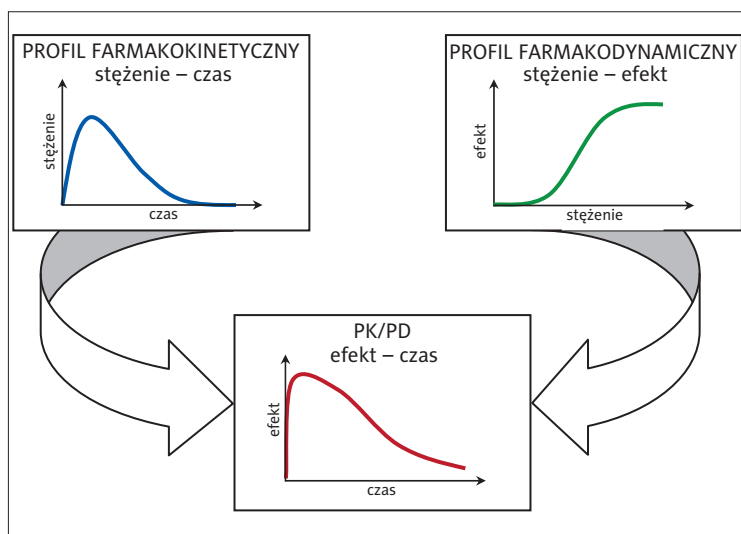
Uzyskane wyniki symulacji, a więc doświadczenia klinicznego przeprowadzonego w całości w warunkach *in silico*, bez angażowania ochotników wykazują wysoką zgodność z danymi klinicznymi. Warto zaznaczyć, że symulacje komputerowe zostały przeprowadzone zgodnie ze schematem badań klinicznych, tak by możliwe było bezpośrednie porównanie wyników. Po potwierdzeniu możliwości platformy symulacyjnej i jakości uzyskiwanych wyników możliwe jest również przeprowadzanie eksperymentów *in silico*. Mogą one obejmować m.in. symulację zmian pór podawania leków, a więc zwiększanie przedziału czasowego między podaniem leku podstawowego oraz inhibitora (ang. *dose staggering*) i ocenę wpływu na stężenie leku w osoczu. Doświadczenia kliniczne oraz analiza mechanizmów interakcji enzymatycznych wskazują na zasadniczy wpływ schematu dawkowania na nasilenie interakcji.

Przykładem zastosowania modułu predykcji wchłaniania leku w przewodzie pokarmowym i jego biodostępności jest publikacja z 2008 roku, gdzie

Modele matematyczne aktywności elektrycznej komórek znane są od lat 50. XX wieku i przełomowej pracy Hodgkina i Huxleya. Pierwszy komputerowy model komórki serca (włókna Purkiniego) został opracowany przez Noble w roku 1962. Podstawowymi ograniczeniami wczesnych modeli było wykorzystanie danych zwierzęcych, dopiero w roku 1998 Pribe i Beuckelmann opublikowali model, w którym dane zwierzęce (uzyskane z doświadczeń wykonanych na świnkach morskich) zastąpili informacjami uzyskanymi z doświadczeń na ludzkich miocytach i dopasowali do nich odpowiednie fragmenty (pojedyncze równania) modelu.

Tabela 1. Wyniki zmian wartości parametrów farmakokinetycznych marawiroku oraz podanego jednocześnie inhibitora enzymatycznego – porównanie symulacji z wynikami badań klinicznych (Hyland, 2008)

Maraviroc (mg)	Inhibitor	Dawka inhibitora (mg)	Zmiana wartości C_{max}		Zmiana wartości AUC	
			w badaniach klinicznych	symulacja	w badaniach klinicznych	symulacja
100	Ketokonazol	400	3,4	3,4	5	4,6
100	Ritonawir	100	1,3	2,3	2,6	2,6
300	Atanazawir	400	2,1	3,6	3,6	5
100	Saquinawir	1200	3,3	4,1	4,3	5,8



Rycina 2. Przykład wykorzystania symulowanych profili farmakokinetycznych do oceny zależności farmakokinetyczno-farmakodynamicznych (PK/PD)

grupa uczonych przeprowadziła doświadczenie polegające na porównaniu wyników badań o charakterze klinicznym oraz symulacji oceniających wchłanianie doustnie podanej insuliny w postaci mikroemulsji [8]. Wyniki wskazują na wysoką zgodność danych realnych oraz wirtualnych.

Farmakodynamika – modele PD

Modele farmakodynamiczne nie zostaną dokładnie scharakteryzowane, jako że wychodzą poza ramy tego cyklu. Niemniej jednak sama ich konstrukcja i sposób działania wskazują na możliwość wykorzystania wyników symulacji zachowania leku w organizmie, jako elementów modeli farmakodynamicznych. Ich główną rolą jest ocena zmian aktywności leku (definiowanego w bardzo różny sposób) w zależności od zmian parametrów farmakokinetycznych – głównie stężenia leku w osoczu. Połączenie tych dwóch elementów pozwala na ocenę zależności farmakokinetyczno-farmakodynamicznych (PK/PD) (**rycina 2**).

Toksykologia – kardiotoxycyzość

Celem tego typu projektów jest wczesna ocena kardiotoxycyzości substancji chemicznych, w oparciu o narzędzia modelowania matematycznego. W tworzonej symulacji warunków *in vivo* człowieka możliwe jest prześledzenie wpływu substancji chemicznej na amplitudę i kształt potencjału czynnościowego (ang. *action potential* – AP) w komórkach serca. Jako dane podstawowe wykorzystuje się uzyskane w warunkach *in vitro* informacje, dotyczące wpływu poszczególnych substancji na przepuszczalność kanałów jonowych (opisane w poprzedniej publikacji tego cyklu). Ich połączenie z modelami matematycznymi komórek komórek serca, pozwala symulować wpływ leków na potencjał czynnościowy serca.

Modele matematyczne aktywności elektrycznej komórek znane są od lat 50. XX wieku i przełomowej pracy Hodgkina i Huxleya [9]. Pierwszy komputerowy model komórki serca (włókna Purkiniego) został opracowany przez Noble w roku 1962 [10]. Podstawowymi ograniczeniami wczesnych modeli, było wykorzystanie danych zwierzęcych, dopiero w roku 1998 Priebe i Beuckelmann opublikowali model, w którym dane zwierzęce (uzyskane z doświadczeń wykonanych na świnkach morskich) zastąpili informacjami uzyskanymi z doświadczeń na ludzkich miocytach i dopasowali do nich odpowiednie fragmenty (pojedyncze równania) modelu [11]. Wyniki uzyskiwane z jego wykorzystaniem były dokładne, jednak ze względu na swój rozmiar i skalę wymagań obliczeniowych model ten był niestabilny. W kolejnych latach rozwój modeli ukierunkowany był zarówno na poprawę stabilności i wydajności obliczeniowej (strona matematyczna), jak i przede wszystkim uzupełnienie możliwie największej liczby parametrów wartościami uzyskiwanymi w wyniku badań na ludzkich miocytach i zastępowanie danych uzyskanych na modelach zwierzęcych wykorzystywanych do tej pory (część fizjologiczna). Wśród najczęściej cytowanych i uznawanych za najlepsze obecnie istniejące, znajdują się modele stworzone przez Ten Tusschera [12], Bernusa [13], Iyer [14], Finka [15], Bueno-Orovio [16]. Celem powstania niemal wszystkich z nich było badanie fizjologii pracy serca oraz analiza mechanizmów powstawania arytmii, jednak obecnie publikowane są zarówno wyspecjalizowane modele, jak i wyniki badań z ich wykorzystaniem, których celem jest analiza wpływu na potencjał czynnościowy komórek komórek serca poszczególnych prądów jonowych, np. potasowych kodowanych przez gen hERG [17].

Jak wspomniano wcześniej, niemal wszystkie modele matematyczne opisujące aktywność elektryczną serca, oparte są na pierwotnej pracy Hodgkin-Huxley w swoich najbardziej podstawowych założeniach. Podobnie jest w modelu Ten Tusscher [12], gdzie błona komórkowa jest traktowana jak kondensator połączony równolegle z bateriami i opornikami, które reprezentują poszczególne prądy jonowe. Zmiany potencjału elektrycznego pojedynczej komórki (V) są więc pochodną pojemności elektrycznej komórki (C_m), oraz potencjałów jonowych (I_{ion} – suma wszystkich potencjałów jonowych, których aktywność jest symulowana z wykorzystaniem modeli dopasowanych do danych doświadczalnych) i zewnętrznych, przyłożonych do błony komórkowej (I_{stim}) (**rycina 3**).

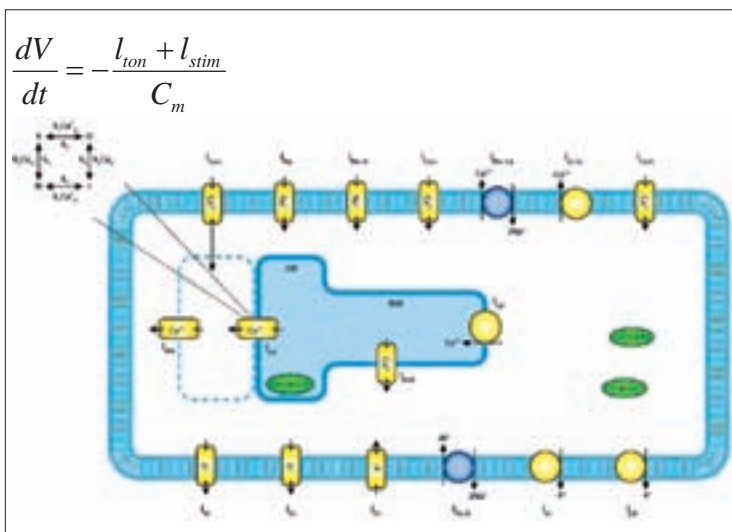
Opisywane modele mogą być implementowane w dowolnym środowisku służącym do wykonywania obliczeń naukowych i symulacji – Matlab, R, Octave i inne, jednak ze względu na popularność i wagę problemu, tworzone są specjalizowane systemy umożliwiające przede wszystkim zapisywanie, ale także wymianę, rozwój i wspólną pracę nad

modelami matematycznymi opisującymi aktywność komórki. Przykładem podobnego przedsięwzięcia jest rozwijany na Wydziale Fizjologii, Anatomii i Genetyki uniwersytetu oxfordzkiego system COR (ang. *Cellular Open Resource*) oparty na środowisku CellML. CellML to język stworzony i rozwijany przez naukowców nowozelandzkiego University of Auckland, oparty na otwartym standardzie XML (ang. *Extensible Markup Language*) oraz MathML (ang. *Mathematical Markup Language*). Celem projektu jest utatwienie wymiany realizowanych komputerowo modeli matematycznych, niekoniecznie rozwiązujących problemy biologiczne. Podstawowe elementy każdego modelu dostępnego w repozytorium (www.cellml.org) obejmują strukturę modelu (organizacja poszczególnych części), część matematyczną (zapis równań) i metadane (dodatkový opis pozwalający na łatwiejsze wyszukiwanie). Interfejsem dla modeli zapisanych w formacie CellML jest m.in. system OpenCell. Całość dostępna jest jako OpenSource i stanowi część większego projektu (Physiome Project), będącego próbą odtworzenia funkcjonalności ciała ludzkiego w postaci równań matematycznych realizowanych w warunkach *in silico*. Podobne przedsięwzięcia są zgodne z obecnym trendem opisywanym jako 3R (ang. *Reduce, Reuse, Recycle*), w przypadku badań nad lekiem, mającym na celu m.in. redukcję ilości zwierząt laboratoryjnych poświęcanych w związku z badaniami. Jednym ze stawianych argumentów, wspierających podobne opinie jest niemożność obserwacji zmienności międzysobniczej (standardowe zwierzęta laboratoryjne). Połączenie opisanych modeli z systemami symulującymi zmiany stężenia leku w organizmie i jego tkankach (PBPK) umożliwia ocenę ryzyka kardiotoksyczności substancji przy zastosowaniu standardowego schematu dawkowania.

Podsumowanie

Ocenia się, że to właśnie techniki *in silico* będą najszybciej rozwijającą się częścią działań rozwoju i badań firm farmaceutycznych. Wynika to z wielu względów, wśród których najważniejsze to wysoka jakość i wiarygodność naukowa systemów modelowania i symulacji oraz możliwość ograniczenia zarówno liczby zwierząt laboratoryjnych poświęcanych w trakcie badań nad nowym lekiem, jak i zmniejszenia liczby niezwykle kosztownych badań klinicznych z udziałem ludzi. Choć na pierwszy „lek z komputera” możemy poczekać jeszcze długo lub, ze względu na złożoność procesu, nigdy się to nie stanie, metody komputerowe zdobyły bardzo silną pozycję i będą się dynamicznie rozwijać.

Otrzymano: 2009.08.28 · Zaakceptowano: 2009.09.30



Rycina 3. Graficzny zapis modelu komórki komory serca ludzkiego Finka (źródło cellml.org)

Piśmiennictwo

- Rostami-Hodjegan A., Tucker G.T.: Simulation and prediction of *in vivo* drug metabolism in human populations from *in vitro* data. *Nature Reviews Drug Discovery* 2007, 6(2): 140–148.
- Hyland, R., Dickins, M., Collins, C., Jones, H., Jones, B. Maravirc: *In vitro* assessment of drug-drug interaction potential. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2008, 66(4): 498–507.
- Paine, M.F., Khalighi M., et al.: Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997, 283(3): 1552–62.
- Von Richter, O., Burk, O., Fromm, M.F., Thon, K.P., Eichelbaum, M., Kivistö, K.T.: Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: A comparative analysis in paired tissue specimens. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2004, 75 (3): 172–183.
- <http://www.simcyp.com>
- <http://www.simulations-plus.com>
- <http://www.systems-biology.com>
- Badwan, A.: Enhancement of oral bioavailability of insulin in humans. *Neuroendocrinology Letters* 2009, 30(1): 101–105.
- Hodgkin A.L., Huxley A.F.: A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 1952,117(4): 500–44.
- Noble, D.: A modification of the Hodgkin-Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pace-maker potentials. *J. Physiol.* 1962, 160: 317–52.
- Priebe L., Beuckelmann D.J.: Simulation study of cellular electric properties in heart failure. *Circ Res.* 1998, 82(11): 1206–23.
- ten Tusscher K. H. W. J., D. Noble, et al.: A model for human ventricular tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004, 286(4): H1573–1589.
- Bernus O., R. Wilders, et al.: A computationally efficient electrophysiological model of human ventricular cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002, 282(6): H2296–308.
- Iyer V., Mazhari R., Winslow R.L.: A computational model of the human left-ventricular epicardial myocyte. *Biophysical Journal* 2004, 87 (3): 1507–1525.
- Fink M., Noble D., Virag L., Varro A., Giles W.R.: Contributions of HERG K⁺ current to repolarization of the human ventricular action potential. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2008, 96 (1–3): 357–376.
- Bueno-Orovio A., Cherry E.M., Fenton F.H.: Minimal model for human ventricular action potentials in tissue. *Journal of Theoretical Biology* 2008, 253(3): 544–560.
- Peitersen T., M. Grunnet, et al.: Computational analysis of the effects of the hERG channel opener NS1643 in a human ventricular cell model. *Heart Rhythm* 2008, 5(5): 734–741.