POLSKI LEK INNOWACYJNY W TERAPII CUKRZYCY TYPU 2 OPARTY NA MECHANIZMIE ODDZIAŁYWANIA POPRZEZ RECEPTOR PPARγ – BADANIA PRZEDKLINICZNE

Rafał A. Derlacz, Adamed Sp. z o.o.; Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii

Janusz Wątroba, StatSoft Polska Sp. z o.o.

Celem projektu: „Polski lek innowacyjny w terapii cukrzycy typu 2 oparty na mechanizmie oddziaływania poprzez receptor PPARγ – badania przedkliniczne" jest stworzenie cząsteczki chemicznej o właściwościach umożliwiających jej wykorzystanie w terapii cukrzycy typu 2. Jednocześnie podstawowym założeniem prowadzonych prac badawczych stało się zminimalizowanie działań niepożądanych towarzyszących obecnie stosowanym lekom, jak hepatotoksyczność, rozrost tkanki tłuszczowej, czy stopniowa utrata funkcji komórek B trzustki.

Przyjęto założenie, iż mechanizm działania cząsteczki będzie polegał na aktywacji receptorów jądrowych PPARγ, które są czynnikami transkrypcyjnymi kontrolującymi aktywność genów regulujących wiele procesów metabolicznych. Badania zaprojektowano tak, aby potwierdzić sposób działania, aktywność biologiczną i bezpieczeństwo dla najlepszego z badanych związków, w takim stopniu, by pozwoliło to na jego wprowadzenie w fazę badań klinicznych.

Aby zwiększyć efektywność i szybkość badań prowadzonych w ramach projektu na początku 2005 roku stworzono Konsorcjum Naukowe, w skład którego obok Adamedu, będącego koordynatorem całego przedsięwzięcia, weszły także trzy duże uczelnie polskie: Uniwersytet Warszawski, Uniwersytet Jagielloński oraz Akademia Medyczna w Gdańsku. W sumie w realizację projektu zaangażowanych jest ponad 40 naukowców.

Epidemiologia cukrzycy

Wzrost liczby zachorowań na cukrzycę przypomina swymi rozmiarami epidemię. W chwili obecnej za jej główną przyczynę uważa się będące konsekwencją otyłości: insulinooporność oraz utratę funkcji komórek sekrecyjnych B trzustki. W efekcie tkanki obwodowe odpowiedzialne za wykorzystanie glukozy (wątroba, kora nerek, mięśnie i tkanka tłuszczowa) wykazują chroniczne pogorszenie odpowiedzi na insulinę, co prowadzi do pojawienia

Copyright © StatSoft Polska 2008

się hiperglikemii, która w sposób istotny przyczynia się do wystąpienia powikłań mikronaczyniowych i sercowo-naczyniowych, w znaczącym stopniu podnosząc zapadalność na inne choroby i śmiertelność. Zmniejszanie wrażliwości tkanek na insulinę oraz utrata glikemii są głównymi objawami tzw. zespołu metabolicznego, którego występowanie coraz częściej kojarzy się z zaburzeniami w funkcjonowaniu receptorów jądrowych PPAR oraz ze zmianami w wydzielaniu adipokin (leptyna, adiponektyna, rezystyna, TNF) przez rozrastającą się brzuszną tkankę tłuszczową.

Rozróżniamy cukrzycę typu 1 i cukrzycę typu 2.

Cukrzyca typu 1 charakteryzuje się całkowitą lub prawie całkowitą utratą zdolności wydzielania insuliny przez komórki B trzustki. Patogeneza tej choroby może być związana z różnymi czynnikami środowiskowymi odpowiedzialnymi za wywołanie reakcji autoimmunologicznej skierowanej przeciwko komórkom warunkującym sekrecję insuliny. Ich śmierć prowadzi do całkowitego uzależnienia pacjenta od egzogennie podawanej insuliny lub jej analogów. Z kolei wspólne występowanie licznych patologicznych zmian w metabolizmie glukozy jest prawdopodobnie przyczyną wysokiego ryzyka powikłań mikro- i sercowo-naczyniowych wśród cierpiących na **cukrzycę typu 2**. Rozwój cukrzycy typu 2 następuje w wyniku współwystępowania łatwych do określenia zaburzeń fizjologicznych, takich jak: 1) oporność mięśni na insulinę, 2) niewystarczająca produkcja insuliny w trzustce, 3) nadmierna produkcja glukozy i 4) oporność tkanki tłuszczowej na insulinę. O wiele trudniejszym zadaniem jest ustalenie molekularnych i biochemicznych przyczyn choroby, ponieważ obejmują one obok wielorakich, niedokładnie poznanych predyspozycji genetycznych szereg czynników środowiskowych.

W związku z obserwowanym na całym świecie dramatycznym wzrostem liczby ludzi chorych na cukrzycę w ciągu ostatnich dwóch dziesięcioleci można mówić o prawdziwej epidemii tej choroby, mimo że słowo „epidemia" w stosunku do choroby przewlekłej wydaje się nieodpowiednie, a leczenie tej choroby może stać się głównym wyzwaniem medycyny XXI wieku. Dotyczy to zwłaszcza cukrzycy typu 2, zapadalność na którą wzrasta zarówno w krajach bogatych, jak i rozwijających się. Obecnie szacuje się, że na świecie na cukrzycę typu 2 cierpi około 150-200 milionów ludzi, i przewiduje się, że do roku 2030 liczba ta wzrośnie do 360 milionów. W krajach bogatych i rozwiniętych gospodarczo będzie to stanowiło blisko 40% wzrost liczby chorych, natomiast w krajach biednych liczba chorych wzrośnie niemal dwukrotnie. W Polsce obecnie na cukrzycę chorują 2 miliony ludzi. Choć u Europejczyków cukrzyca typu 2 występuje zwykle po pięćdziesiątym roku życia, to wśród mieszkańców południowej Azji i wysp Pacyfiku zaobserwowano znacznie wcześniejsze pojawienie się tej choroby. Co więcej, stwierdzono, że częstość występowania cukrzycy typu 1 u młodzieży amerykańskiej w wieku dojrzewania wzrosła dziesięciokrotnie, a u młodzieży japońskiej blisko 40-krotnie w ciągu jednego pokolenia.

Fakt, że cukrzyca nie daje się ująć jako pojedyncza choroba o ściśle określonej etiologii, lecz jest częścią zespołu patologicznych objawów, ma poważne konsekwencje dla strategii leczenia tej choroby. Wszystkie współczesne terapie przeciwcukrzycowe mają charakter leczenia objawowego. Społeczne i ekonomiczne koszty leczenia cukrzycy są już obecnie

 Copyright © StatSoft Polska 2008

wysokie. Choroba pochłania około 5-8% budżetu służby zdrowia na świecie, a przewiduje się dalszy gwałtowny wzrost kosztów. Główna ich część związana jest przy tym nie z farmakologiczną regulacją poziomu cukru we krwi, lecz z leczeniem ciężkich powikłań powodowanych przez tę chorobę. W przeprowadzonym w 2002 r. badaniu „Koszty cukrzycy typu 2 w Polsce (Badanie CODIP)" ustalono, iż całkowite koszty bezpośrednie leczenia choroby osiągają poziom 2,6 mld PLN. Obliczona kwota stanowi 8,08% wszystkich nakładów poniesionych na opiekę zdrowotną w Polsce w 2002 r. Z kolei badanie POL-MONICA 2001 przeprowadzone w Polsce w populacji miejskiej – Warszawa – pokazuje, że otyłość dotyka ponad 30% mężczyzn i 27% kobiet, podczas gdy w populacji wiejskiej, która była reprezentowana przez dawne woj. Tarnobrzeskie, ponad 20% mężczyzn i blisko 30% kobiet.

Leczenie cukrzycy

W początkowym etapie leczenie cukrzycy typu 2 obejmuje zazwyczaj porady i zalecenia dotyczące modyfikacji diety, zmniejszenia masy ciała i zwiększenia wysiłku fizycznego. Takie działania rzadko jednak okazują się skuteczne ze względu na niechęć pacjentów do zmiany trybu życia i konieczne staje się podawanie doustnych leków przeciwcukrzycowych, często w połączeniu z insuliną lub w terapii skojarzonej. Obecnie najczęściej stosowane są doustne leki poprawiające glikemię, wśród których wydzielono cztery grupy, ze względu na ich mechanizm działania:

Pochodne sulfonomocznika (glimepirid, glibenklamid)

Są one skuteczne jedynie w przypadku leczenia cukrzycy z zachowaną czynnością wydzielniczą trzustki. Ich działanie polega na pobudzaniu wydzielania insuliny przez komórki β wysp trzustkowych. Głównymi zagrożeniami stosowania pochodnych sulfonomocznika jest możliwość wystąpienia hipoglikemii (nadmiernego obniżenia poziomu cukru), zwiększenie wagi ciała oraz możliwość interakcji z wieloma grupami leków. Skuteczność leków z tej grupy jest ograniczona w czasie i zwykle po upływie kilku lat biochemiczne wskaźniki kontroli cukrzycy pogarszają się. Nie zatrzymują postępu choroby ani nie wpływają na podstawowe przyczyny cukrzycy typu 2. Głównym niebezpieczeństwem stosowania tej grupy leków jest pojawiająca się w czasie utrata funkcji sekrecyjnej komórek B trzustki.

Pochodne biguanidu (metformina)

Trudno jest jednoznacznie wskazać mechanizm działania metforminy. Z jednej strony poprzez zahamowanie fosforylacji oksydacyjnej powoduje ona zmniejszenie syntezy ATP w mitochondriach. Efektem takiego działania jest ograniczenie wątrobowej resyntezy glukozy oraz opóźnienie jelitowego wchłaniania glukozy. Z drugiej strony poprzez aktywację kinazy zależnej od AMP (AMPK), pośrednio w efekcie zahamowania syntezy ATP, „zmusza" komórki do prowadzenia coraz bardziej intensywnego metabolizmu i wykorzystywania znajdujących się w organizmie źródeł węglowodanów. Dodatkowo

pochodne biguanidu wykazują korzystne działanie na profil lipidowy – metformina obniża poziom frakcji cholesterolu LDL, trójglicerydów oraz podwyższa poziom HDL. Niestety leki te dają liczne efekty uboczne: dolegliwości ze strony układu pokarmowego (wynikające z gromadzenia się leku w ścianie i świetle przewodu pokarmowego), ryzyko wystąpienia kwasicy i śpiączki mleczanowej oraz nadmiernej utraty wagi ciała.

Inhibitory alfa-glukozydaz jelitowych (akarboza, miglitol)

Powodują obniżenie wchłaniania jelitowego glukozy, a tym samym mniejszy poposiłkowy przyrost glikemii. Nie wpływają na zwiększenie wydzielania insuliny, zmniejszenie glukoneogenezy wątrobowej, czy też zmniejszenie insulinooporności tkanek. Ich działania uboczne związane są w głównej mierze z dolegliwościami ze strony układu pokarmowego wynikające ze zwiększonej fermentacji bakteryjnej niestrawionych węglowodanów.

Pochodne tiazolidynodionów (pioglitazon, roziglitazon)

Selektywne ligandy receptora PPAR gamma poprzez jego aktywację regulują ekspresję genów kodujących białka zaangażowane w regulację metabolizmu węglowodanów i lipidów. Ich działanie przejawia się głównie poprzez zwiększenie insulinowrażliwości tkanek obwodowych, obniżenie glukoneogenezy wątrobowej, poprawę profilu wydzielniczego tkanki tłuszczowej. Obniżeniu poziomu glukozy we krwi towarzyszy spadek poziomu wolnych kwasów tłuszczowych, trójglicerydów oraz zwiększenie poziomu frakcji HDL. Często opisywany jest korzystny wpływ stosowania tiazolidynodionów na funkcjonowanie komórek B wysp trzustkowych (poprzez obniżenie poziomu wolnych kwasów tłuszczowych). Do działań niepożądanych możemy zaliczyć zwiększenie retencji płynów ustrojowych, zwiększenie wagi ciała i podwyższenie poziomu enzymów wątrobowych (ALAT i ASPAT), co może sugerować toksyczny wpływ na wątrobę.

Inhibitory proteazy DPPIV (wildagliptyna, sitagliptyna)

W 2007 roku wprowadzono na rynek nową klasę leków przeciwcukrzycowych będących inhibitorami proteazy DPPIV. Zahamowanie aktywności tego enzymu przyczynia się do podwyższenia poziomu we krwi tzw. hormonów inkretynowych, a w szczególności GLP-1 – glukagonopodobnego peptydu 1, którego obecności wpływa korzystnie na parametry funkcjonalne komórek B trzustki.

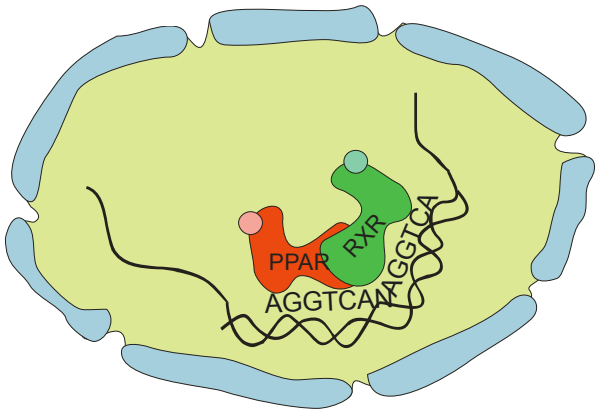
Mechanizm działania – modulacja aktywności receptora PPARγ

Jądrowe receptory aktywowane proliferatorami peroksysomów (PPAR, *peroxisome proliferator-activated receptor*) to czynniki transkrypcyjne, których stymulacja wpływa na metabolizm glukozy i tłuszczy, wrażliwość tkanek na insulinę, przebieg procesów zapalnych, odpowiedź immunologiczną oraz podziały i różnicowanie komórek. Peroksysomy są organellami powszechnymi niemal we wszystkich komórkach eukariotycznych, szczególnie duże i liczne występują w hepatocytach i komórkach kanalików proksymalnych. Znajdują

 Copyright © StatSoft Polska 2008

się w nich enzymy uczestniczące w β-oksydacji średnio i długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, tak nasyconych, jak i nienasyconych, metabolizmie cholesterolu, aminokwasów, puryn oraz w procesach oksydo-redukcyjnych.

Pierwsze receptory jądrowe PPAR zostały odkryte w 1990 roku w komórkach wątroby i określone mianem PPARα, od tego czasu sklonowano i scharakteryzowano trzy rodzaje receptorów: α, β/δ oraz γ. Zidentyfikowano także co najmniej trzy warianty PPARγ (γ1, γ2, γ3), które powstają na drodze alternatywnego składania genu.



Rys. 1. Mechanizm działania receptorów jądrowych PPAR.

Budowa receptorów PPAR jest podobna, wszystkie zawierają cztery główne domeny: (i) N-końcową domenę transaktywacyjną, niezależną od obecności liganda (domena A/B), (ii) domenę wiążącą DNA (domena B), (iii) domenę przyłączającą ligand (domena C) oraz (iv) C-końcową domenę E/F zawierającą miejsce wiązania liganda i zależną od liganda domenę transaktywacyjną. Choć receptory PPAR różnych typów (α β/δ i γ) charakteryzują się wysoką zgodnością na poziomie sekwencji aminokwasowej i struktury przestrzennej, to jednak dzięki istotnym różnicom w obrębie domeny wiążącej ligand mogą łączyć się z różnymi cząsteczkami, co w efekcie prowadzi do wywołania odmiennych efektów biologicznych. Ich aktywatorami są substancje naturalne (kwas arachidonowy, kwasy tłuszczowe, prostaglandyny) oraz syntetyczne (tiazolidinendiony, fibraty). Należące do tiazolidinendionów roziglitazon i pioglitazon oraz niektóre prostaglandyny aktywują PPARγ, fenofibrat oraz kwasy tłuszczowe i ich pochodne aktywują PPARα, podczas gdy PPARβ/δ ulega aktywacji w odpowiedzi na kwas arachidonowy. Po związaniu liganda receptory PPAR łączą się z receptorem retinoidowym X (RXR), a powstający dimer rozpoznaje i wiąże odpowiedni fragment DNA (PPRE – PPAR-response element), prowadząc do aktywacji konkretnych genów kontrolujących przemiany metaboliczne węglowodanów i lipidów (rys 1).

Receptory PPAR biorą udział w patogenezie grupy chorób określanych wspólnym mianem tzw. zespołu metabolicznego, poprzedzającego pojawienie się pełnoobjawowej cukrzycy typu 2, charakteryzującego się utratą wrażliwości na insulinę i będącą tego konsekwencją hiperinsulinemią, zaburzeniem metabolizmu glukozy, otyłością, dyslipidemią (obniżeniem poziomu HDL i wzrostem zawartości triglicerydów), nadciśnieniem, miażdżycą tętnic, mikroalbuminurią oraz nadkrzepliwością. Wydaje się, że najsilniej patogennym procesem

w rozwoju zespołu metabolicznego jest utrata wrażliwości na insulinę. Co szczególnie ważne, fibraty będące agonistami PPARα przechodzą testy kliniczne jako potencjalne leki normalizujące poziom lipidów, podczas gdy tiazolidinendiony aktywujące PPARγ są już stosowane w leczeniu cukrzycy typu 2. Coraz więcej dowodów świadczy o możliwości stosowania aktywatorów PPARβ/δ w celu zwiększenia wrażliwości na insulinę i obniżenia dyslipidemii. Dodatkowo aktywatory receptorów jądrowych PPAR są uważne za związki o potencjalnie dużym znaczeniu terapeutycznym w leczenie nadciśnienia, miażdżycy i nefropatii. Jest to o tyle zrozumiałe, że geny znajdujące się pod kontrolą PPAR biorą udział w wielu procesach zachodzących nieprawidłowo u osób z zespołem metabolicznym.

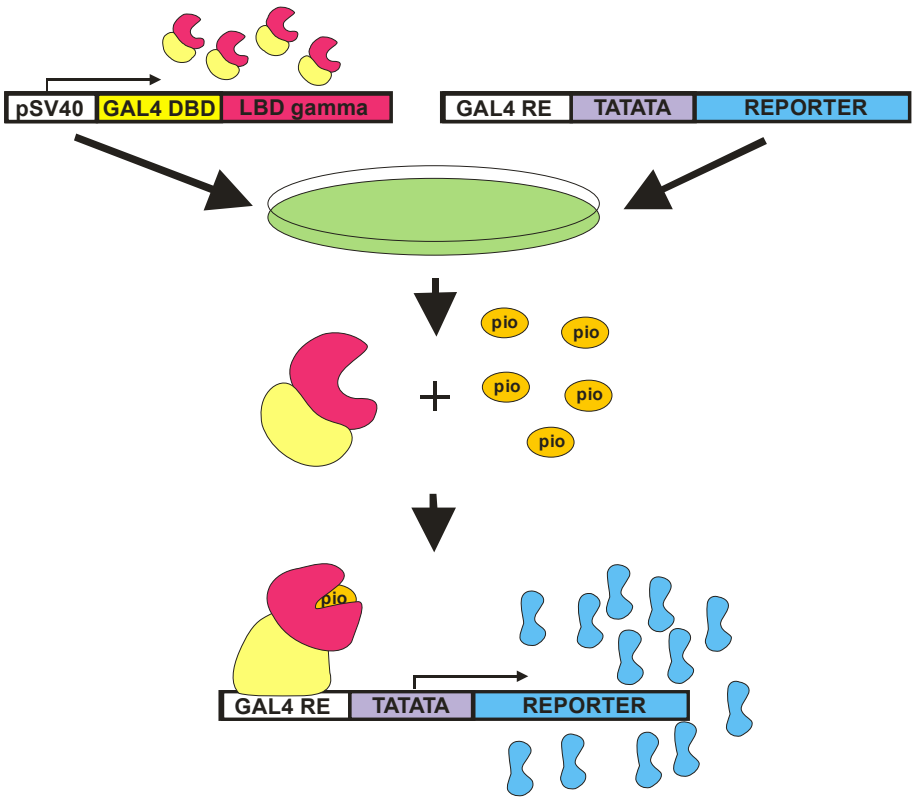
Badania przesiewowe *in vitro*

Projektując cząsteczkę chemiczną, musieliśmy wziąć pod uwagę to, że aby dotrzeć do receptorów PPAR znajdujących się w jądrze komórkowym, musi się ona przedostać przez bariery biologiczne, jakie stanowią błona komórkowa i otoczka jądrowa. Musi być ona także w pewnym sensie „niewidoczna" dla innych niż nasz cel białek znajdujących się w komórce.

W sumie stworzyliśmy bibliotekę związków chemicznych składającą się z blisko 7 tysięcy cząsteczek – synteza kolejnych odbywała się po uprzedniej ocenie zdolności wiązania do receptora cząsteczek już zsyntetyzowanych, w efekcie dzięki ścisłej współpracy Laboratorium Chemicznego i Laboratorium Biologicznego nie było konieczne tworzenie gigantycznych bibliotek zawierających wiele tysięcy molekuł. Jest to jedna z ważniejszych zdobyczy projektu PPAR, w trakcie realizacji którego wypracowaliśmy system dynamicznej oceny jakości powstających związków. Na poziomie testów *in vitro* związki były oceniane pod kątem: a) zdolności wiązania do receptora PPARγ, b) zdolności do aktywacji receptora w układzie *in vitro*, c) zdolności do indukcji powstawania komórek tłuszczowych, d) oceny toksyczności na poziomie linii komórkowych, e) możliwości indukcji powstawania nowych naczyń krwionośnych f) możliwości hamowania endogennej produkcji glukozy oraz g) zdolności do zaburzenia funkcjonowania mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Zastosowanie tak wielu kryteriów oceny umożliwiło nam maksymalne „przesianie" posiadanej biblioteki i wybór do drogich testów z wykorzystaniem modeli zwierzęcych jedynie najbardziej obiecujących cząsteczek.

Ocenę wiązania się do receptora umożliwiał prosty test, w którym badaliśmy zdolność „naszych" związków do wypierania z kompleksu z receptorem cząsteczki referencyjnej wyznakowanej radioaktywnie. Ponieważ wiązanie do receptora odbywa się na zasadzie dopasowania typu klucz-zamek, tylko te cząsteczki mogły wyprzeć znakowany radioaktywnie ligand z kompleksu z receptorem, które miały odpowiednią strukturę przestrzenną, pasującą do miejsca wiążącego na receptorze. Z siedmiu tysięcy przebadanych cząsteczek 16 % okazało się zdolnych do wiązania do receptora PPAR.

 Copyright © StatSoft Polska 2008

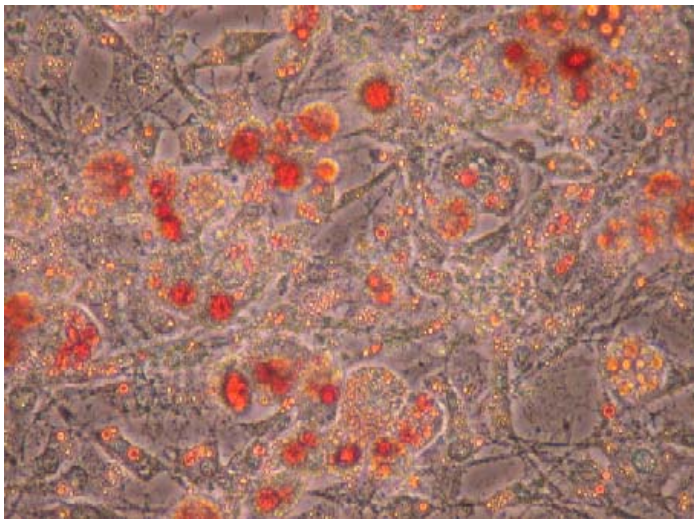


Rys. 2. Test pozwalający na ocenę zdolności badanych cząsteczek do aktywacji receptora PPARγ w układzie komórkowym.

Kolejnym etapem badań było ustalenie, czy dana cząsteczka, wiążąca się do receptora, jest jego aktywatorem. Samo wiązanie do receptora PPARγ nie musiało przekładać się na jego aktywację, czy nawet modulację aktywności (rys. 2). Głównym punktem tego etapu prac było stworzenie linii komórkowej zawierającej dwa konstrukty genetyczne. Konstrukt A – w skład którego wchodzi DNA kodujące domenę wiążącą ligand receptora PPAR oraz DNA kodujące domenę wiążącą DNA czynnika transkrypcyjnego GAL4, produktem białkowym tego konstruktu jest hybrydowe białko zawierające domenę wiążącą ligand oraz domenę wiążącą DNA. Konstrukt B – w skład którego wchodzi tzw. gen reporterowy (czyli taki, którego produkty możemy w łatwy sposób mierzyć i na podstawie szybkości ich powstawania ocenić efektywność aktywacji receptora PPAR przez „nasz" ligand) pod kontrolą promotora dla czynnika transkrypcyjnego GAL4. Test aktywacji receptora przeszło pomyślnie blisko 400 cząsteczek.

Niezwykle ważnym elementem badań był test umożliwiający określenie, czy „nasza" cząsteczka ma charakter adipogenny, czyli stymulujący rozrost tkanki tłuszczowej, czy też nie. Niektóre z obecnie stosowanych leków przeciwcukrzycowych powodują przy długotrwałym podawaniu nadmierne magazynowanie tłuszczu i w efekcie sprzyjają tyciu. Staramy się tak modyfikować strukturę powstających w Laboratorium Chemicznym związków, by jak najbardziej ograniczyć ten proces. W teście nazwanym umownie testem adipogenności badaliśmy zdolność związków do stymulowania przekształcania mysich fibroblastów w komórki tłuszczowe (rys. 3).

Copyright © StatSoft Polska 2008



Rys. 3. Mysie fibroblasty różnicujące pod wpływem aktywatorów receptora PPARγ w komórki tłuszczowe. Wybarwione na czerwono obszary to nagromadzające się we wnętrzu komórek trójglicerydy.

Badania *in vivo* – potwierdzenie efektywności działania

Ponieważ naszym celem jest opracowanie leku doustnego, czyli takiego, który byłby maksymalnie przyjazny dla pacjentów, niezbędne było sprawdzenie, czy zaprojektowane przez nas związki wchłaniają się do krwi po podaniu dożołądkowym. Dopiero po uzyskaniu informacji potwierdzającej taką właściwość mogliśmy przejść do badań na mysich modelach cukrzycy typu 2 – myszach *db/db* (C57BLKS *db/db*).

Po przebadaniu 101 cząsteczek uzyskaliśmy informację, iż zastosowane przez nas kryteria – szybkie wchłanianie i co najmniej kilkugodzinna stabilność we krwi – spełniają 64 związki. Pierwszym krokiem w badaniach *in vivo* było wstępne określenie skuteczności działania nowych cząsteczek z wykorzystaniem mysiego modelu cukrzycy typu 2 – myszy *db/db*. Takie postępowanie umożliwiło przeprowadzenie badań bez konieczności syntetyzowania dużych ilości związków, co często wiązałoby się ze znacznym zwiększeniem kosztów projektu. Badania zaplanowaliśmy tak, iż zwierzęta w wieku około 7-8 tygodni, u których potwierdzono rozwój cukrzycy typu 2, zostały podzielone na grupy składające się z 10 osobników każda. W badaniach obok grup doświadczalnych – otrzymujących badany związek – stworzyliśmy grupę kontrolną 1 (zwierzęta zdrowe), grupę kontrolną 2 (zwierzęta chore otrzymujące placebo) oraz grupę kontrolną 3 (zwierzęta otrzymujące lek referencyjny – roziglitazon). Ocenę skuteczności działania nowych związków prowadziliśmy w teście, w którym gryzonie otrzymywały badany preparat w dawce 10 mg/kg masy ciała przez 14 kolejnych dni. Po zakończeniu testu poddawaliśmy analizie parametry biochemiczne krwi, jak poziom glukozy, glikowanej hemoglobiny (HbA1c), trójglicerydów, HDL oraz LDL. W przypadku potwierdzenia działania terapeutycznego (na przykład obniżenie poziomu glukozy i HbA1c) związki były kierowane do Laboratorium Chemicznego, gdzie opracowywano drogę syntezy w dużej skali, a następnie ich efektywność była

 Copyright © StatSoft Polska 2008

potwierdzana na drugim modelu cukrzycy typu 2 – szczurach ZDF. **Celem tych badań było wytypowanie 1 cząsteczki, która zostanie skierowana do badań w standardzie GLP**.

Badania prowadzono na samcach szczurów ZDF/GmiCrl-fa/fa (*Zucker Diabetic Fatty*) pochodzących z hodowli Charles River Laboratories (Francja). Przed rozpoczęciem badań zwierzęta poddano dwutygodniowej kwarantannie w pomieszczeniu bytowym zwierzętarni, czas oświetlenia regulowano automatycznie 12 godz. noc/12 godz. dzień. Zwierzęta karmiono karmą Formulab Diet 5008 Lab Diet, zarówno wodę jak i karmę podawano *ad libitum*. W badaniach obok grup doświadczalnych, podobnie, jak miało to miejsce w przypadku myszy *db/db*, stworzyliśmy grupę kontrolną 1 (zwierzęta zdrowe), grupę kontrolną 2 (zwierzęta chore otrzymujące placebo) oraz grupę kontrolną 3 (zwierzęta otrzymujące lek referencyjny – roziglitazon). Ocenę skuteczności działania nowych związków prowadziliśmy w teście, w którym szczury otrzymywały badany preparat w dawce od 2 do 20 mg/kg masy ciała przez 14 kolejnych dni.

Rys. 4. Szczur ZDF (*Zucker Diabetic Fatty*) będący powszechnie stosowanym modelem doświadczalnym cukrzycy typu 2.

W ostatnim dniu doświadczenia po uśpieniu zwierząt pobrano krew oraz w dwóch powtórzeniach niewielkie fragmenty: tkanki tłuszczowej podskórnej i tkanki tłuszczowej z najądrzy, wątroby, kory nerek, mięśni oraz serca. Tkanki przeniesiono do próbówek typu Eppendorf (2 ml) i natychmiast umieszczono w pojemniku z ciekłym azotem. Pobrany materiał przechowywano następnie w temp. –80°C.

Copyright © StatSoft Polska 2008

W otrzymanych surowicach oznaczono następujące parametry: stężenie glukozy, HbA1c, poziom cholesterolu, HDL, LDL, triglicerydów, kreatyniny, mocznika, bilirubiny, albuminy oraz aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT) i aminotransferazy asparaginianowej (ASP). Glikowaną hemoglobionę (HbA1c) oznaczono w pełnej krwi.

Badania w standardzie GLP – potwierdzenie bezpieczeństwa

Po uzyskaniu informacji potwierdzających aktywność biologiczną związków na szczurzym modelu cukrzycy typu 2 najaktywniejsza cząsteczka zostanie skierowana na dokładne badania, których celem jest określenie właściwości farmakokinetycznych oraz bezpieczeństwa związku. To oczywiście wymaga ponownego opracowania syntezy cząsteczek, tym razem już w skali półtechnicznej (1–10 kg). Wszystkie badania zgodnie z zaleceniami FDA będą prowadzone w standardzie GLP (*Good Labolatory Practice*). W związku z olbrzymimi kosztami badań prowadzonych na tym etapie projektu, ze względów ekonomicznych nie jest możliwe skierowanie do badań większej liczby cząsteczek. **Dlatego też analiza wyników uzyskanych w trakcie doświadczeń *in vivo*, z wykorzystaniem zwierzęcych modeli cukrzycy typu 2, jest kluczowym elementem całego projektu**. W gruncie rzeczy w tym miejscu podejmowana jest decyzja o dalszych losach całego przedsięwzięcia.

Dobra praktyka laboratoryjna (GLP) od lat siedemdziesiątych wchodzi w skład przepisów obowiązujących w przemyśle farmaceutycznym. Zalecenia FDA pozwoliły przemysłowi farmaceutycznemu upewnić się co do wiarygodności badań przedklinicznych, zwłaszcza w zakresie toksykologii. Ponadto rozszerzenie zasad GLP przez OECD, a następnie ich przyjęcie w krajach Unii Europejskiej, umocniło przekonanie o konieczności wdrożenia i przestrzegania zasad GLP w celu wzajemnej akceptacji danych naukowych w poszczególnych krajach.

W krajach wysoko uprzemysłowionych, zrzeszonych w Organizacji Współpracy Ekonomicznej i Rozwoju (OECD), a także w krajach Wspólnoty Europejskiej istnieje wymóg prawny, by wyniki badań substancji i preparatów chemicznych przedstawiane w celu oceny ryzyka ich stosowania oraz ustanowienia odpowiednich norm higienicznych spełniały wymogi wysokiej, gwarantowanej jakości i wiarygodności. Aby wymóg ten mógł być spełniony, kraje te wprowadziły zasady GLP, czyli dobrej praktyki laboratoryjnej, których celem jest promowanie jakości i wiarygodności badań. Dobra praktyka laboratoryjna jest pojęciem opisującym uporządkowane zasady postępowania praktycznego przy wykonywaniu badań oraz przedsięwzięcia organizacyjne niezbędne do stworzenia odpowiednich warunków planowania, przeprowadzania i monitorowania badań oraz zapisywania uzyskiwanych wyników, a także ich przedstawiania. Celem nadrzędnym przepisów regulujących GLP jest wprowadzenie systemów i ustanowienie procedur, które zapewnią wymaganą jakość i powtarzalność badań.

W dalszych etapach projektu zostanie wykonana synteza substancji czynnej i walidacja metod analitycznych na potrzeby badań na zwierzętach w standardzie GLP. W Laboratorium Formulacji opracowana zostanie forma leku, mająca postać tabletki do podania doustnego. W tym celu do substancji czynnej dodane zostaną substancje pomocnicze,

 Copyright © StatSoft Polska 2008

tzw. wypełniacze, które pozwolą na uzyskanie odpowiednich parametrów fizyko-chemicznych ostatecznej formy potencjalnego leku (wyglądu, twardości, ścieralności, czasu rozpadu w płynach ustrojowych, odpowiedniego profilu uwalniania substancji czynnej). Doświadczenia *in vivo* na modelach zwierzęcych z zastosowaniem opracowanej formy potencjalnego leku pozwoli na potwierdzenie jego właściwości farmakokinetycznych.

Dla jednego, wybranego związku zostaną wykonane badania ADME, toksykologiczne i farmakodynamiczne w jednostkach badawczych posiadających certyfikat Good Laboratory Practice. Całość badań w standardzie GLP podsumowana zostanie raportami wystawionymi przez jednostki certyfikowane, zawierającymi wyniki uznawane na szczeblu międzynarodowym.

W ramach prac wdrożeniowych wykonana zostanie synteza 3 niezależnych szarż substancji czynnej według zoptymalizowanych (zwalidowanych) warunków prowadzenia reakcji. Synteza ta odbędzie się w skali 1/10 docelowej skali produkcyjnej dla każdej z szarż i będzie przebiegać w Dziale Syntezy Dużej firmy Adamed z użyciem specjalistycznych urządzeń. Próby substancji czynnej pobrane z poszczególnych szarż zostaną skierowane na badania stabilności w komorach starzeniowych. Następnie w Dziale Produkcyjnym firmy Adamed zostaną wykonane 3 szarże produkcyjne docelowej postaci leku w ilości 100 tys. jednostek (tabletek) każda. Próby gotowej postaci leku pochodzące z każdej szarży zostaną umieszczone w komorach starzeniowych w celu zbadania ich stabilności. Tak opracowany i wyprodukowany potencjalny lek będzie spełniał kryteria dopuszczenia do I fazy badań klinicznych.

Do opisanych wyżej prac zostanie wykonana dokumentacja *Drug Master File*, która jest niezbędna przy sprzedaży licencji na rynku międzynarodowym. Wymagana jej zawartość została określona w dokumencie *Notice to Applicants* (NTA) opracowanym przez Komisję Europejską w konsultacji z właściwymi władzami krajów członkowskich oraz Europejską Agencją ds. Leków (EMEA). Ostatnia wersja dokumentu pochodzi z czerwca 2004 r.

Na podstawie wszystkich uzyskanych wyników zostanie opracowana i złożona w amerykańskiej agencji rejestrującej nowe leki – FDA dokumentacja IND (*Investigational New Drug Application*). Po jej pozytywnym rozpatrzeniu, związek chemiczny będący potencjalnym lekiem na cukrzycę typu 2 zostanie dopuszczony do I fazy badań klinicznych.

Trudności przy interpretacji wyników badań przedklinicznych

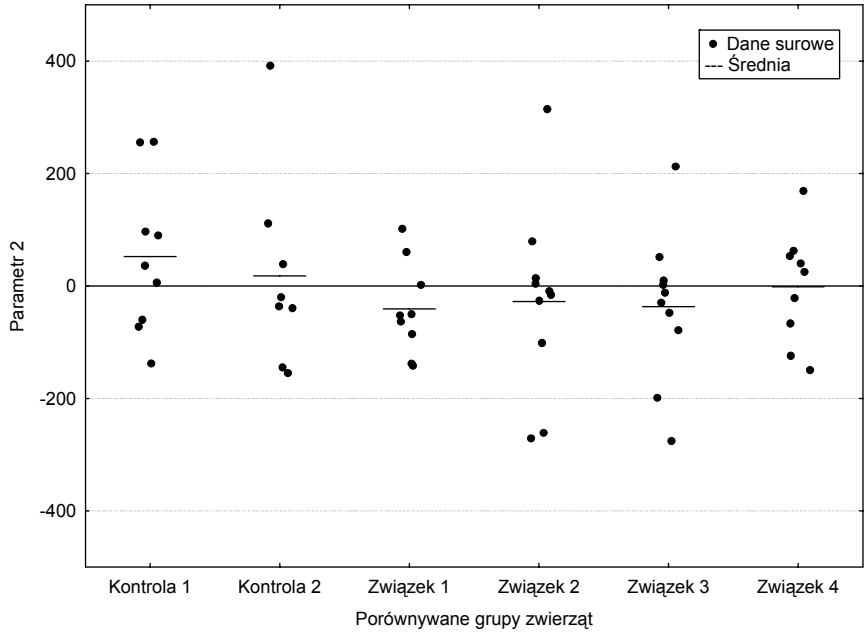
Specyfika badań przedklinicznych sprawia, że zarówno sposób ich poprawnego zaplanowania, jak i analiza uzyskanych wyników stwarza zazwyczaj pewne trudności. Jednym z głównych powodów jest konieczność pogodzenia wymagań, które często nawzajem się wykluczają. Przykładem może być problem stosownej liczebności badanych grup zwierząt. Z jednej strony większa liczebność gwarantuje zazwyczaj większą (w sensie statystycznym) wiarygodność wyników, z drugiej jednak strony oznacza konieczność zapewnienia dużo większej liczebnie zbiorowości badanych zwierząt, co z kolei znacznie podnosi koszty. Ponadto użyte do badań zwierzęta nie powinny zbytnio różnić się od siebie pod

względem wyjściowego poziomu branych pod uwagę parametrów biochemicznych. W praktyce oznacza to konieczność przyjmowania rozwiązania kompromisowego.

Dla osoby przeprowadzającej analizę wyników badań przedklinicznych stosunkowo największą trudność sprawia odpowiednie przełożenie pytań, jakie stawia sobie badacz przy przeprowadzaniu danego eksperymentu, na sposób opracowania zebranych danych. Z punktu widzenia badacza rezultaty eksperymentu powinny zostać przedstawione w taki sposób, aby umożliwiały łatwą ocenę reakcji na podawane związki, zarówno poszczególnych zwierząt (aby wychwycić ewentualne niepożądane skutki uboczne), jak i całościową ocenę efektu podawania określonego związku w grupie zwierząt, które go otrzymywały. Porównując skutki działania poszczególnych związków, badacz jest ponadto zainteresowany łatwym zestawieniem wyników dla kilku czy nawet kilkunastu branych pod uwagę parametrów biochemicznych w sytuacji, gdy ich poziom jest zwykle wyrażany w różnych jednostkach i liczbami różnego rzędu.

W dalszej części zaprezentowano i krótko omówiono wybrane wyniki jednego z przeprowadzonych eksperymentów. Jego głównym celem była ocena reakcji badanych zwierząt na wybrane cztery związki, które podawano przez okres 14 dni. W eksperymencie występowały również dwie grupy kontrolne (placebo i lek referencyjny).

Poniżej zamieszczono wykres ilustrujący zmiany poziomu Parametru 2 zaobserwowane po zakończeniu eksperymentu. Wykres umożliwia ocenę zarówno wielkości zmian u każdego z poddanych badaniu zwierząt, jak i (poprzez odniesienie do poziomu 0) określenie, u ilu zwierząt w porównywanych grupach nastąpiło podniesienie poziomu oznaczanego parametru, a u ilu jego obniżenie.

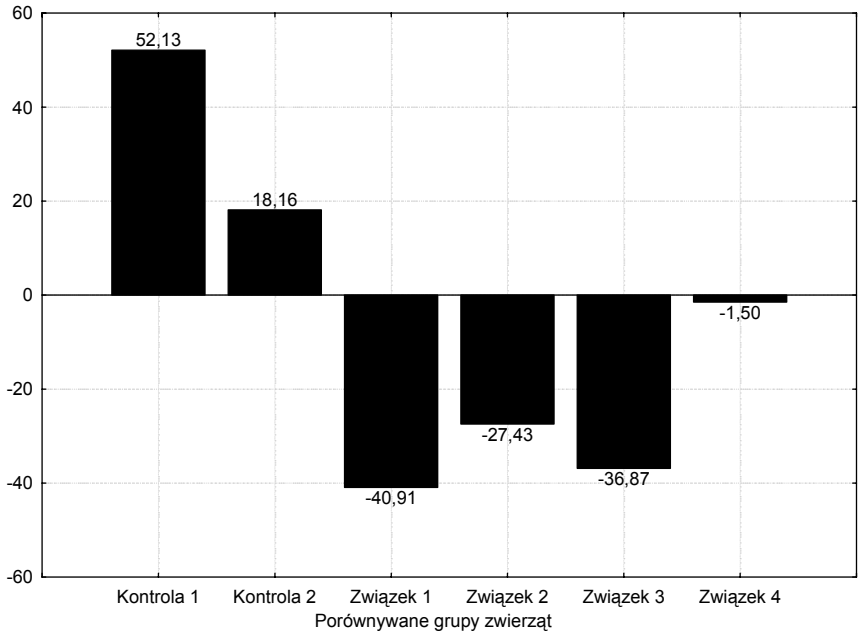


Rys. 5. Wykres końcowych indywidualnych zmian Parametru 2.

 Copyright © StatSoft Polska 2008

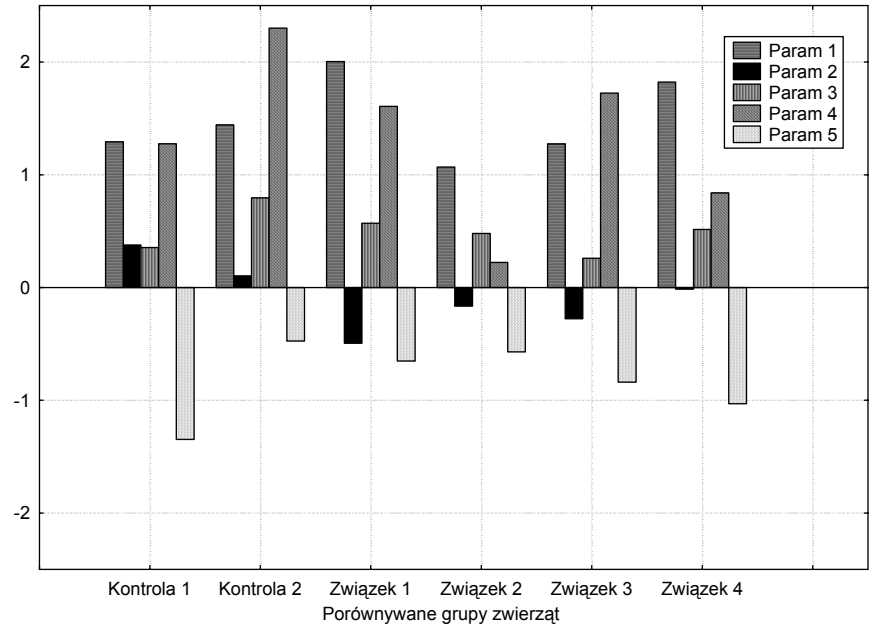
Przykładowo w pierwszej grupie kontrolnej u dwóch zwierząt obserwowano podwyższenie poziomu o ponad 250 jednostek. Jeśli chodzi o porównywane w eksperymencie związki, to można stwierdzić, że w przypadku związków 1, 2 i 3 u większości badanych zwierząt nastąpiło obniżenie poziomu Parametru 2. Odwrotna sytuacja ma miejsce w przypadku związku 4. Jednocześnie w przypadku zwierząt, które otrzymywały związki 1 i 4, rozrzut wyników był stosunkowo najmniejszy. Pozostaje pytanie czy ten mniejszy rozrzut wynika ze sposobu działania tych związków czy też powodem jest charakterystyka zwierząt doświadczalnych, które je otrzymywały.

Dla ułatwienia oceny działania porównywanych związków oraz całościowych zmian, jakie zaszły w grupach kontrolnych na kolejnym wykresie przedstawiono profil zróżnicowania średnich wielkości zmian poziomu Parametru 2 odniesionych do poziomu „0" (brak zmian). Wykres pokazuje bardzo wyraźnie, że w obydwu grupach kontrolnych nastąpiło podwyższenie poziomu Parametru 2, szczególnie widoczne w grupie kontrolnej 1. Jednocześnie we wszystkich grupach zwierząt, które otrzymywały porównywane związki można zauważyć obniżenie przeciętnego poziomu branego pod uwagę parametru. Stosunkowo najmniejsze zmiany zaszły w grupie zwierząt otrzymujących związek 4.



Rys. 6. Profil zróżnicowania średnich zmian Parametru 2.

Jak to zostało już wcześniej wspomniane, przy interpretacji wyników badań przedklinicznych badacz jest bardzo zainteresowany możliwością jednoczesnej oceny efektów (w sensie wielkości i kierunku zmian) działania porównywanych związków dla wielu branych pod uwagę parametrów biochemicznych. Dla umożliwienia takiej oceny przeprowadzono analizę zmian poziomu oznaczanych parametrów biochemicznych. Wyniki analizy zilustrowano za pomocą wykresu profili zróżnicowania zmian.



Rys. 7. Profile końcowego zróżnicowania zmian poziomu badanych parametrów biochemicznych.

Na podstawie przedstawionego wykresu można przykładowo łatwo zauważyć, że w przypadku wszystkich porównywanych związków (łącznie z obiema grupami kontrolnymi) nastąpił wzrost poziomu parametru 1, 3 i 4 oraz jednoczesne obniżenie poziomu parametru 5.

Wydaje się, że taki sposób całościowego ujęcia wyników eksperymentu daje możliwość łatwej odpowiedzi na pytania postawione przez badacza, a jednocześnie ułatwia podjęcie decyzji na temat całościowej oceny sposobu działania porównywanych związków.

 Copyright © StatSoft Polska 2008