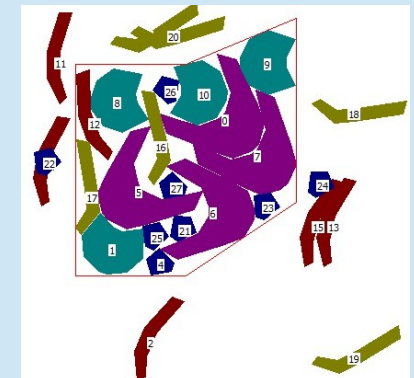
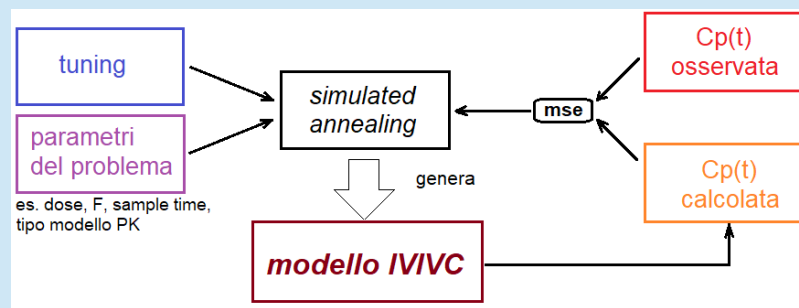
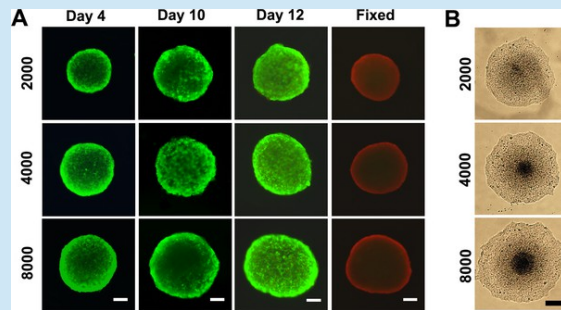
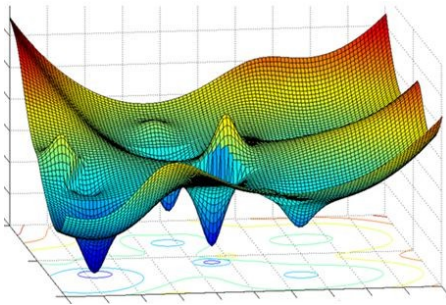


Impiego di algoritmi euristici in campo scientifico: applicazioni in farmacologia





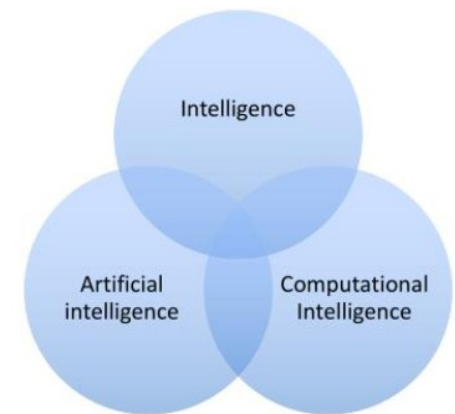
Intelligenza Computazionale

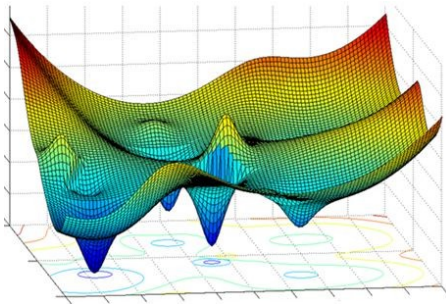
L'*Intelligenza Artificiale* è la disciplina che studia il comportamento intelligente e mira ad emularlo sulle macchine per farle "pensare" e comportarsi come esseri umani (es. comprensione del linguaggio, interazione con esseri umani, analisi video ed immagini, diagnosi, ecc.).

Alcune carenze dell'IA (es. grandi moli di dati per l'apprendimento, rischi di bias, tempi di apprendimento notevoli, non infallibilità, ecc.) hanno aperto nuove strade per algoritmi non convenzionali i quali hanno dato vita a una nuova disciplina detta **Intelligenza Computazionale** (IC).

Le tecniche di IC utilizzano anche l'IA ma seguono un percorso diverso da questa.

L'**Intelligenza Computazionale** studia i sistemi informatici che hanno capacità di adattamento, tolleranza ai guasti ed alta velocità di calcolo grazie a meccanismi che abilitano un comportamento intelligente in ambienti complessi e mutevoli.

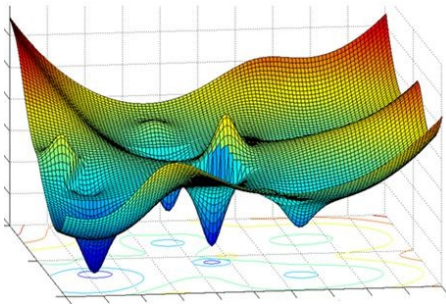




Intelligenza Computazionale

I meccanismi adattivi includono i seguenti paradigmi di *Intelligenza Artificiale*:

- *swarm intelligence*
(SI; sistemi semplici che interagiscono fra loro e con l'ambiente facendo emergere schemi funzionali globali del sistema)
 - *reti neurali artificiali*
(ANN; modelli matematici ispirati alle reti neurali biologiche)
 - *calcolo evolutivo*
(EC; algoritmi che risolvono problemi di ottimizzazione emulando alcune leggi della natura)
 - *sistemi immunitari artificiali*
(AIS; algoritmi che risolvono vari tipi di problemi emulando il comportamento del sistema immunitario degli esseri viventi)
 - *sistemi fuzzy*
(FS; algoritmi basati sull'estensione della logica booleana ai valori intermedi fra 0 ed 1)
- Tutti questi paradigmi hanno la capacità di apprendere o adattarsi a nuovi ambienti.



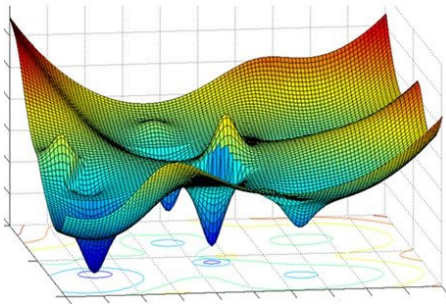
Intelligenza Computazionale

Le sfide complesse e sempre più difficili in diversi campi applicativi sono rappresentate da problemi in cui è necessario

- ottimizzare grandi insiemi di parametri
- comprendere fenomeni ed estrarre conoscenza dai dati
- prevedere l'andamento futuro di fenomeni o grandezze.

Le nuove tecniche e metodologie di *Intelligenza Computazionale* (IC) consentono di ottenere soluzioni per risolvere problemi complessi che non possono essere affrontati con metodologie tradizionali di hard computing.

La IC ha dunque un'importanza notevole nei sistemi reali in cui si combina l'operato dell'uomo (utente) con il mondo digitale.

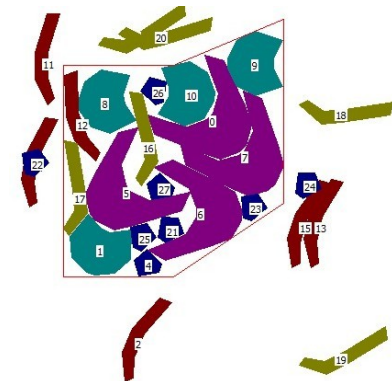
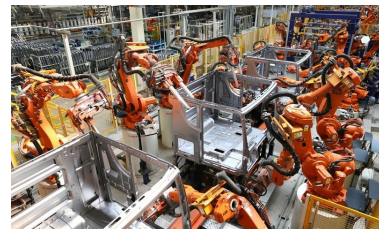
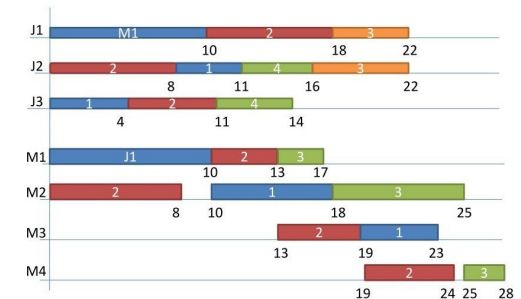


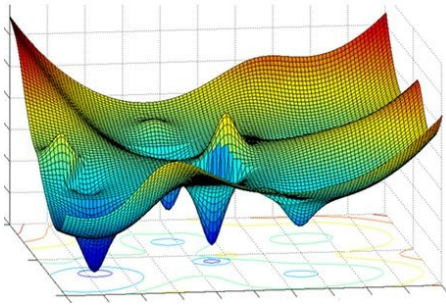
Intelligenza Computazionale

La IC può essere impiegata sia in fase di progetto che di controllo del sistema.

Queste sono solo alcune delle tipiche mutevoli esigenze in relazione a diversi scenari di richieste:

- gestire i processi produttivi
- pianificare la produzione
- allocare le risorse ed ottimizzarne l'impiego
- definire i parametri di funzionamento
- valutare la robustezza e la resilienza
- identificare e prevenire problemi di varia natura





Intelligenza Computazionale

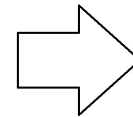
La IC permette lo sviluppo di modelli che prevedono i comportamenti di un sistema per

- identificare situazioni critiche/anomale e mettere in atto contromisure adeguate
- garantire in real-time il corretto funzionamento del sistema (es. sistemi di guida autonoma).

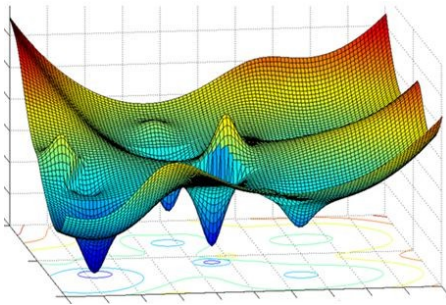
sistema reale



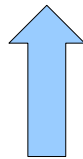
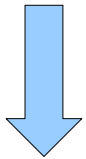
modello



La IC usa le informazioni osservate e/o quelle prodotte dall'IA per programmare e/o configurare i sistemi reali per farli funzionare meglio e per raggiungere gli obiettivi prefissati.



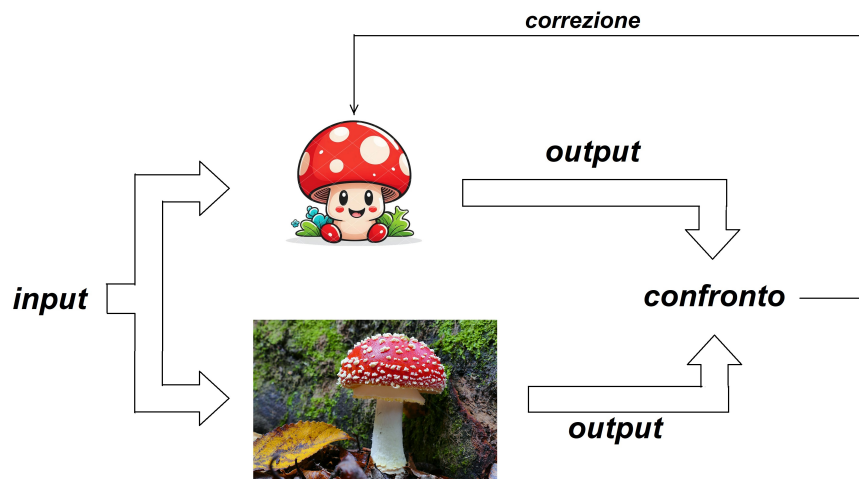
osservare, comprendere e predire



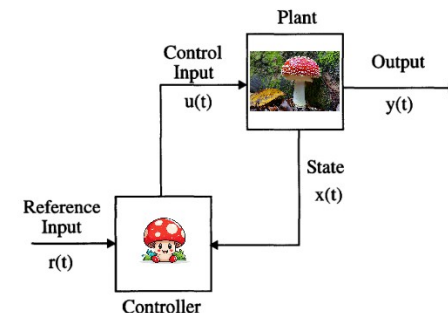
La IC usa i dati generati dal sistema reale (es. una macchina, un insieme di macchine, ecc.) per costruire un suo “modello” virtuale.

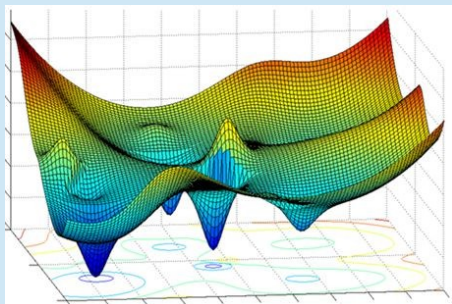
Il modello si può utilizzare, ad esempio, per simulare i comportamenti del sistema reale in varie situazioni.

Le informazioni generate del modello possono guidare (feedback/controllo) il sistema reale affinché siano perseguiti gli obiettivi prefissati.



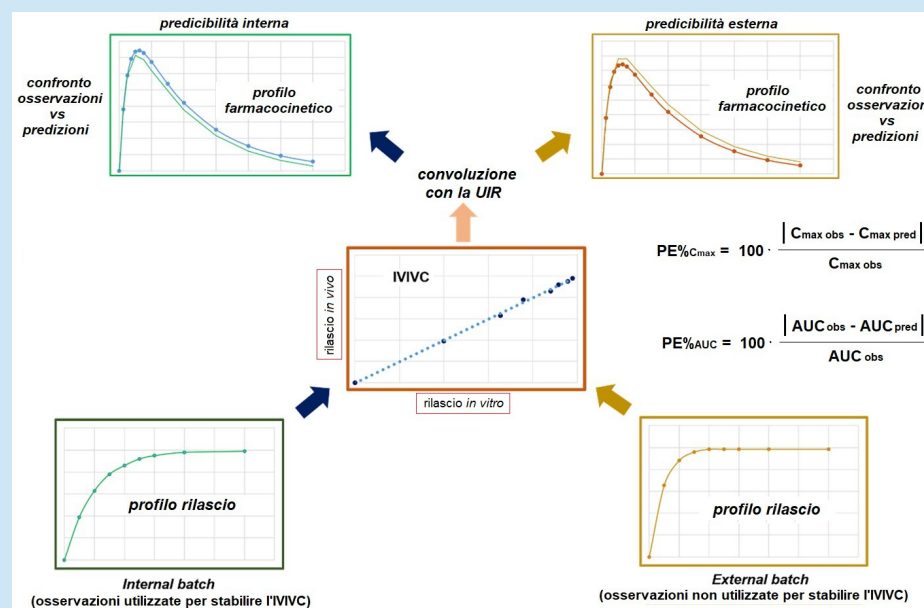
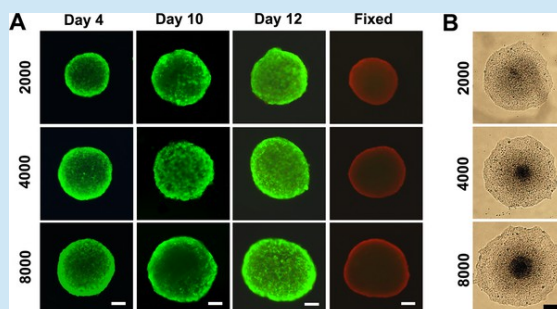
- Obiettivo del controllo ottimo è determinare i segnali di controllo tali per cui il sistema da controllare soddisfi determinati vincoli fisici e allo stesso tempo renda minimo o massimo un qualche criterio scelto per misurarne le performance.

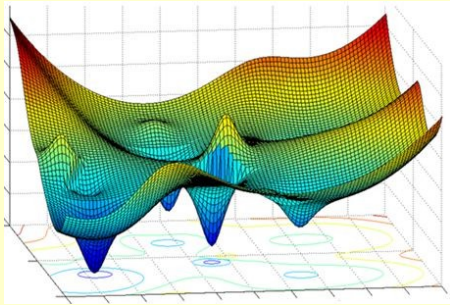




applicazioni di algoritmi euristici in campo farmaceutico

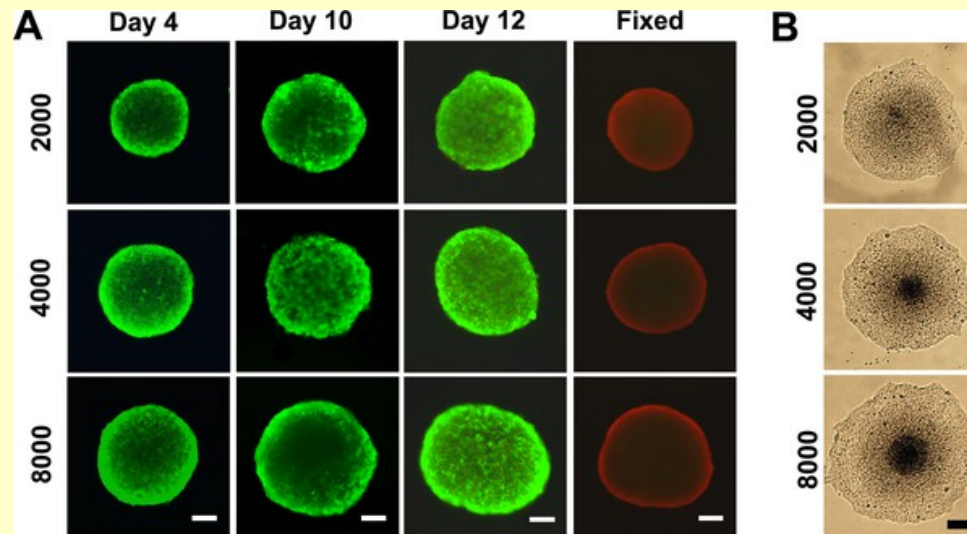
gli algoritmi euristici (es. simulated annealing, genetici, taboo search, ...; heurískō "trovo", hèurēka "ho trovato") ottimizzano una funzione basandosi su una metafora fisica e/o evolutiva

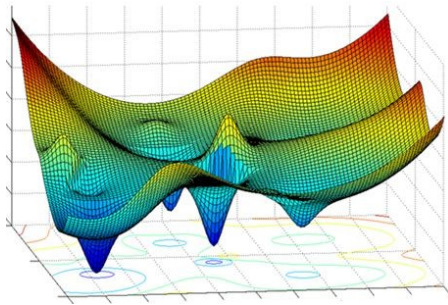




sferoidi e doxorubicina

(modelli matematici analitici, funzione costo numerica, simulazioni, validazione modelli, emersione di nuovi fatti)





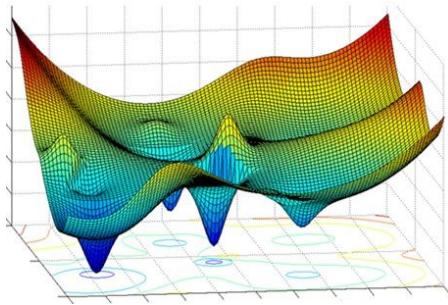
sferoidi e doxorubicina

Gli sferoidi sono aggregati cellulari tridimensionali (3D) che riproducono le caratteristiche di tessuti e microtumori.

Neli ultimi anni vengono sviluppati *in vitro* sferoidi tumorali da utilizzare come modelli di ambienti tissutali *in vivo* al fine di valutare la sicurezza dei farmaci e per l'identificazione di potenziali composti terapeutici antitumorali.

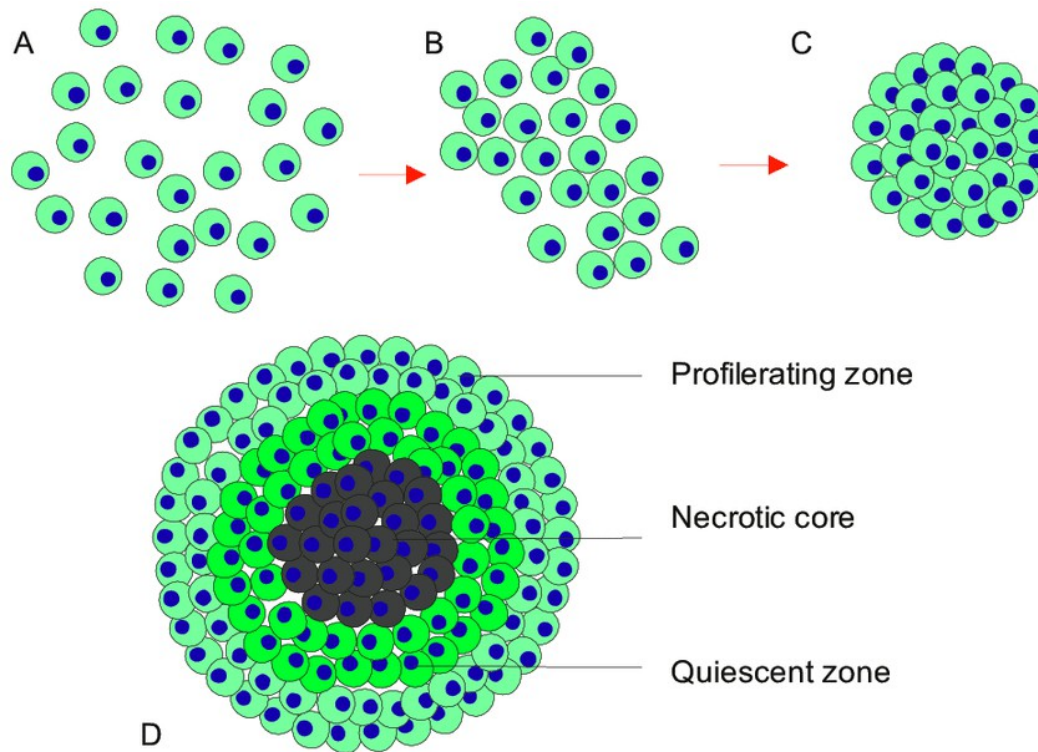
Si ritiene che gli sferoidi riproducano il comportamento dei tumori in maniera più efficace rispetto alle normali colture cellulari bidimensionali (2D) perché, proprio come i tumori, contengono sia cellule esposte in superficie che cellule relegate in profondità, cellule proliferanti e non proliferanti, un centro ipossico e uno strato esterno di cellule ben ossigenate.

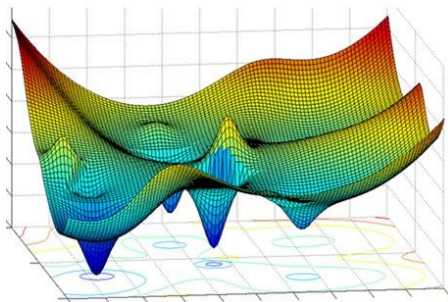
In particolare, **permettono di rivelare la capacità (o incapacità) dei farmaci di infiltrarsi nei tumori, nonché i loro effetti inibitori sulle metastasi.**



sferoidi e doxorubicina

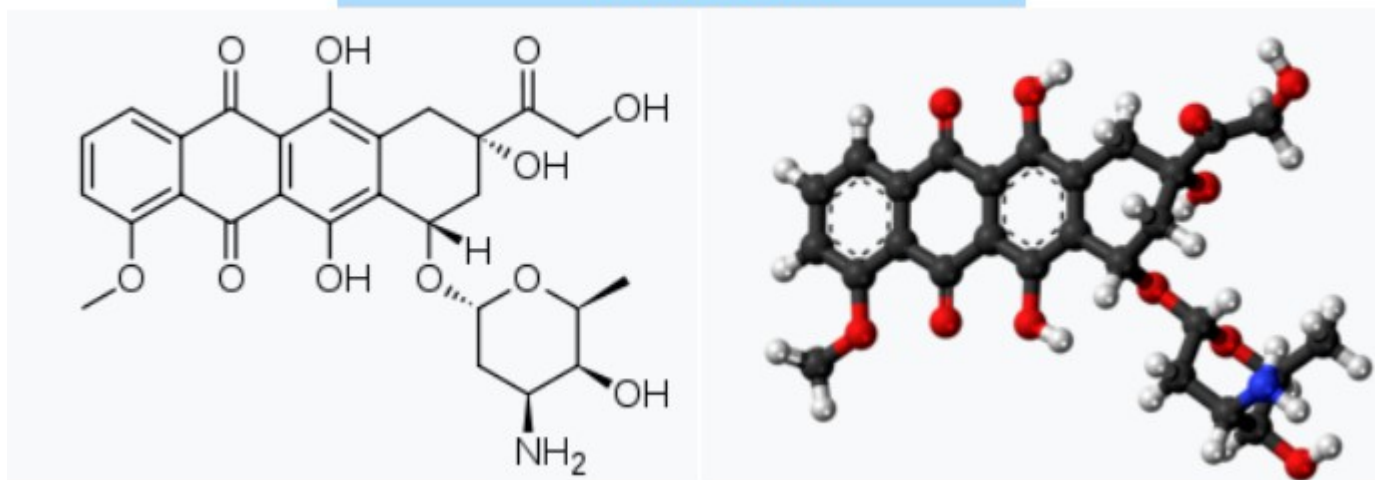
sferoide:





sferoidi e doxorubicina

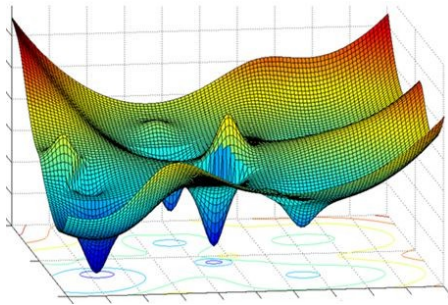
Doxorubicina



antibiotico (*antraciclina*) antineoplastico con ampio spettro antitumorale; si lega alla *topoisomerasi II* ed al DNA inibendone sintesi e trascrizione, inoltre induce aberrazioni cromosomiche;

possiede una **naturale fluorescenza rossa**.

<https://it.wikipedia.org/wiki/Doxorubicina>



sferoidi e doxorubicina

Alcuni sferoidi sono stati fatti crescere in vitro per un certo tempo (almeno 72 ore) partendo da tre dimensioni iniziali diverse: 500, 2000 e 4000 cellule.

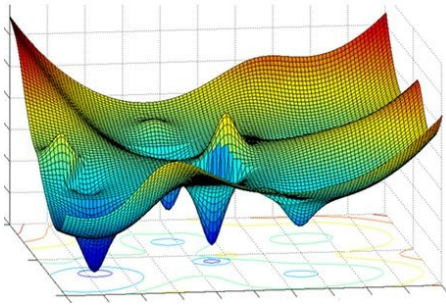
Alcuni sono stati fatti crescere senza trattamento chemioterapico.

Altri invece in ambienti aventi diverse concentrazioni di doxorubicina:

0.16 μ M, 0.3125 μ M, 0.625 μ M, 1.25 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M.

Grazie a sofisticati strumenti sono stati stimati, ad intervalli di tempo più o meno regolari, i valori di fluorescenza e l'area (sezione massima) degli sferoidi.

Problema: individuare un modello matematico in grado di simulare l'andamento dell'area (sezione massima) osservata in laboratorio al fine di poter condurre successivamente altre simulazioni più approfondite su come viene assorbito il farmaco e su come esso agisce



sferoidi e doxorubicina

Spesso le dinamiche di crescita delle popolazioni (individui, cellule, ...) seguono il *modello di Gompertz* (eq. differenziale ordinaria, ODE):

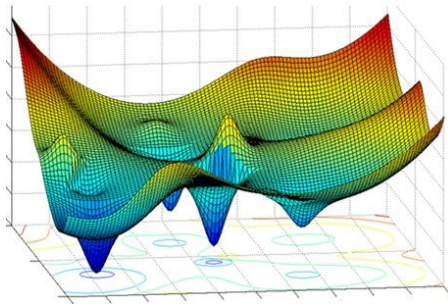
$$\frac{dY(t)}{dt} = r Y(t) \ln\left(\frac{\Theta}{Y(t)}\right) \quad \rightarrow \quad Y = \Theta e^{\left(\ln\left(\frac{Y_0}{\Theta}\right)\right) e^{-rt}}$$

$Y(t)$ numero di individui

r tasso di crescita medio

Θ num. individui quando la popolazione raggiunge l'equilibrio (massima crescita)

Si può assumere che $Y(t)$ rappresenti l'area della sezione massima dello sferoide che varia nel tempo. I parametri Θ , Y_0 ed r sono incogniti ma si può tentare la loro stima grazie ai valori misurati dai campioni.



sferoidi e doxorubicina

Sotto queste ipotesi, si vuole identificare un predittore (regressione non lineare) a partire da tutte le osservazioni (coppie $[t_i, Y_i]$ intese come la media aritmetica dei valori osservati ad ogni istante t_i).

Si utilizza un algoritmo di ottimizzazione (*simulated annealing*) con l'obiettivo di minimizzare in modo complessivo gli errori residui

$$\varepsilon = Y(t_i) - Y_i$$

in base ad una metrica (funzione costo), essendo

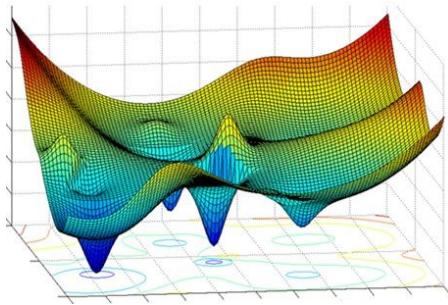
$Y(t_i)$ i valori calcolati con il modello (area della superficie massima)

Y_i i valori misurati (le medie matematiche di cui sopra)

t_i gli istanti di tempo (ore) in cui sono state condotte le misure.

E' stata utilizzata la metrica

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \varepsilon^2}$$



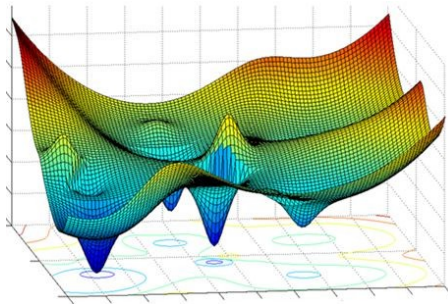
sferoidi e doxorubicina

obiettivo: comprendere se il fenomeno di crescita è indipendente dal numero di cellule di partenza degli sferoidi

Si considerano i tre processi di misura (500, 2000 e 4000 cellule) come condotti in momenti diversi mentre uno stesso sferoide si evolve nel tempo.

In pratica è come se il primo set di valori venisse misurato a partire dal momento in cui nello sferoide ci sono 500 cellule e si proseguisse in modo analogo quando lo sferoide contiene 2000 e poi 4000 cellule.

Con questa assunzione, alle incognite del *modello di Gompertz* si aggiungono i tre istanti di tempo (dt_1 , dt_2 e dt_3 , relativi al $t_{\text{biologico}} = 0$) che identificano la partenza dei tre processi di misura.

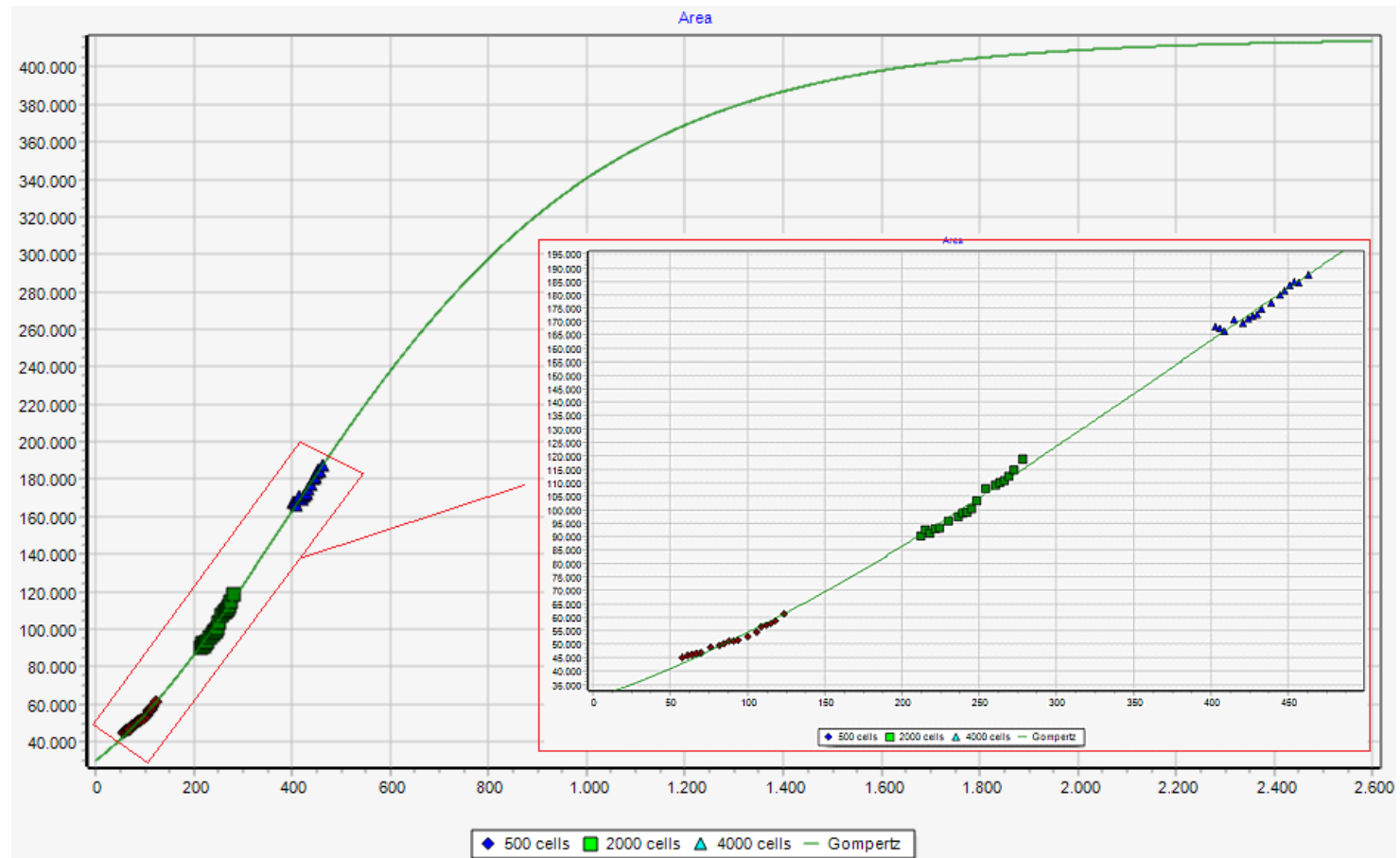


sferoidi e doxorubicina

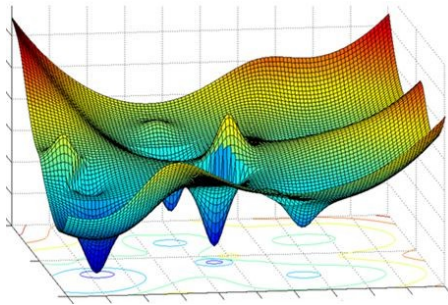
risultato:

$$r = 0,002569$$

$$\Theta \cong 416280$$



si noti che l'algoritmo ha trovato anche i valori di Y_0 (area iniziale, inizio della curva) e degli istanti ipotetici di tempo dt_1 , dt_2 e dt_3 in cui sono iniziate le misure)



sferoidi e doxorubicina

obiettivo: individuare un modello per il fenomeno di crescita degli sferoidi in presenza di doxorubicina

La crescita delle cellule tumorali quando sono in atto trattamenti chemioterapici si può descrivere con l'equazione differenziale ordinaria (ODE) seguente:

$$\frac{dY(t)}{dt} = r Y(t) \ln\left(\frac{\Theta}{Y(t)}\right) - \delta u(t) Y(t)$$

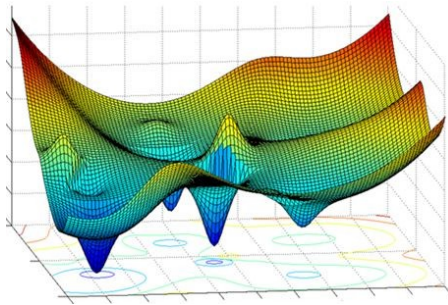
$u(t)$ esprime l'effetto del farmaco, mentre δ rappresenta la dose.

Per questo problema si assume che il numero di cellule uccise sia proporzionale alla massa tumorale (la terapia è più efficace quando il tumore è esteso).

Si è fatta l'ipotesi che l'effetto $u(t)$ sia il risultato di tre processi concorrenti:

- l'attività della doxorubicina nell'impedire la proliferazione cellulare
- i meccanismi che le cellule mettono in campo per neutralizzare il chemioterapico
- la riduzione nel tempo del tasso di crescita tumorale r poiché le cellule che riescono a sopravvivere non sono efficienti come quelle che non sono mai entrate in contatto con la doxorubicina

La bontà delle assunzioni sarà confermata o meno dai risultati.



sferoidi e doxorubicina

Il modello matematico di cui si desidera individuare i parametri è dunque il seguente:

$$\frac{dY(t)}{dt} = r(t)Y(t) \ln\left(\frac{\Theta}{Y(t)}\right) - \delta U_a(t)U_b(t)Y(t)$$

essendo

$$U_a(t) = \frac{u_c}{1 + e^{-\gamma_a(t - t_a)}}$$

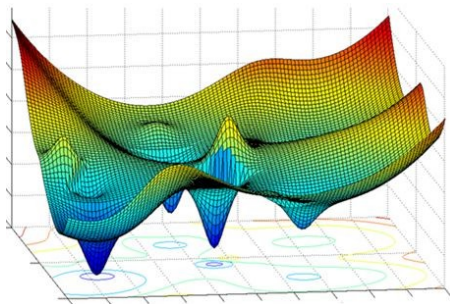
$$U_b(t) = \frac{1}{1 + e^{\gamma_b(t - t_b)}}$$

$$r(t) = r e^{-\gamma_c t}$$

Si possono ora utilizzare i risultati trovati prima, ossia $r = 0,002569$ e $\Theta \cong 416280$, per implementare il nuovo modello in cui sono incognite Y_0 ed i parametri che determinano l'effetto farmacologico $u(t) = U_a(t)U_b(t)$.

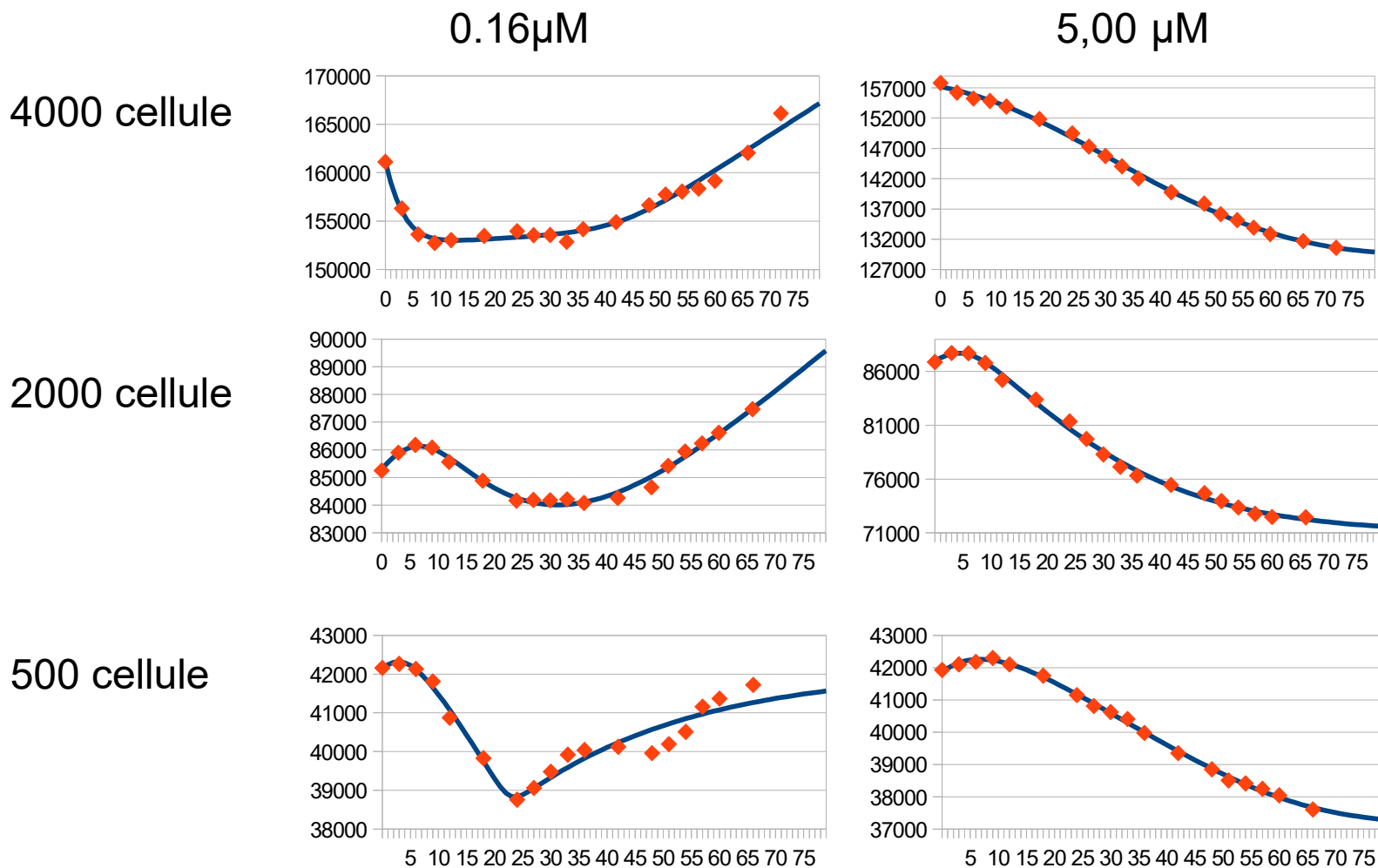
L'istante $t = 0$ del modello coincide con il momento in cui viene somministrata la dose δ .

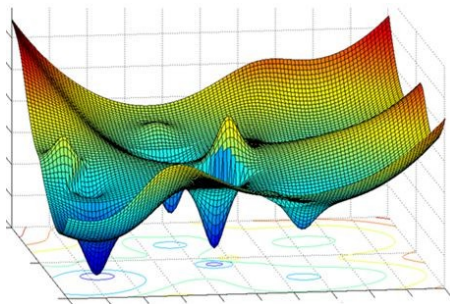
Si procede come prima, ossia si impiega l'algoritmo di ottimizzazione (simulated annealing) con l'obiettivo di minimizzare la funzione costo RMSE.



sferoidi e doxorubicina

area sezione sferoidi ($R^2 \approx 0,98$): in rosso i valori osservati



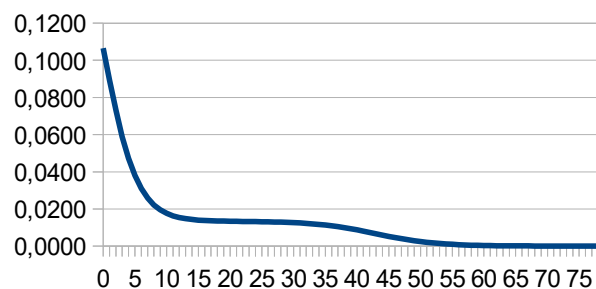


sferoidi e doxorubicina

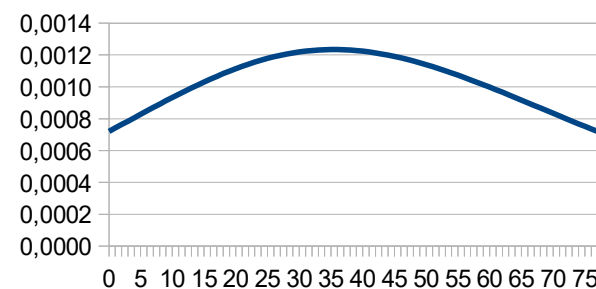
effetto $u(t) = U_a(t)U_b(t)$

4000 cellule

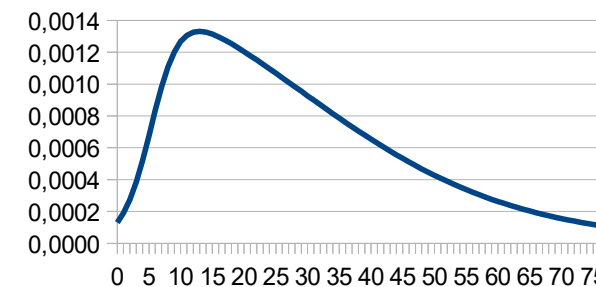
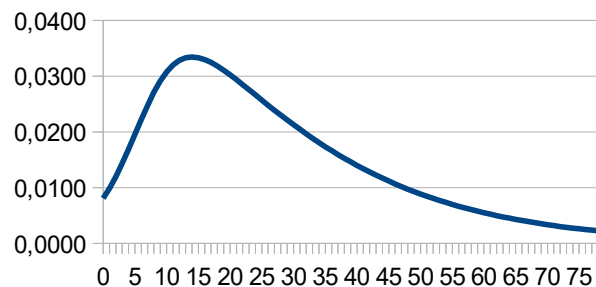
0.16 μ M



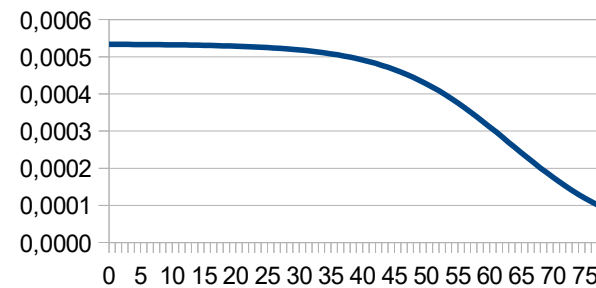
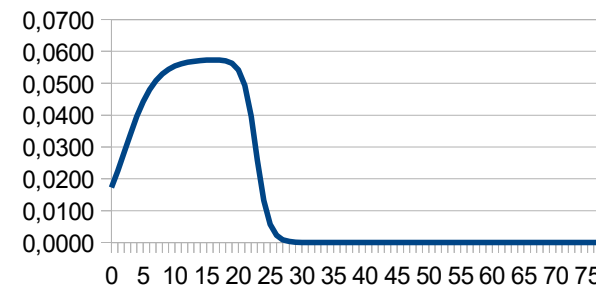
5,00 μ M

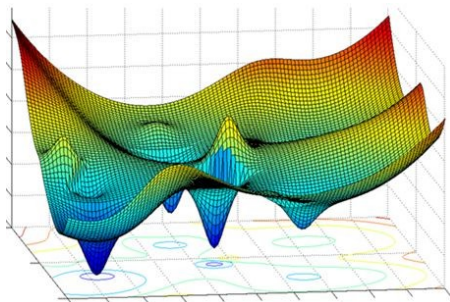


2000 cellule



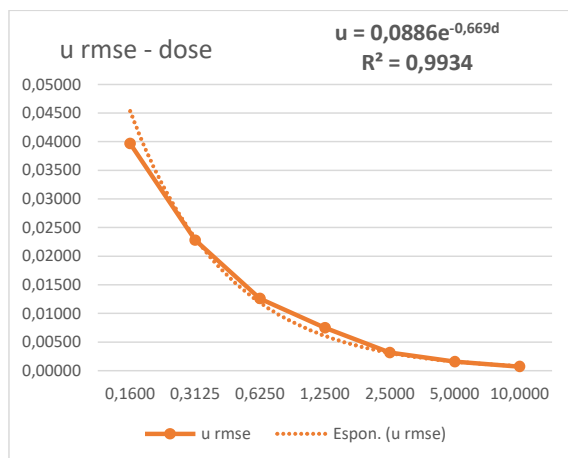
500 cellule



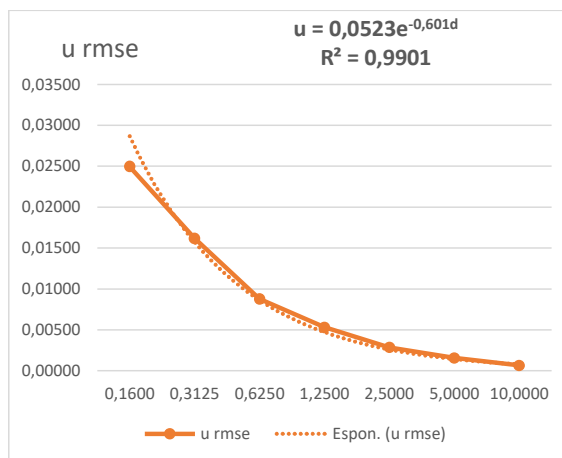


sferoidi e doxorubicina

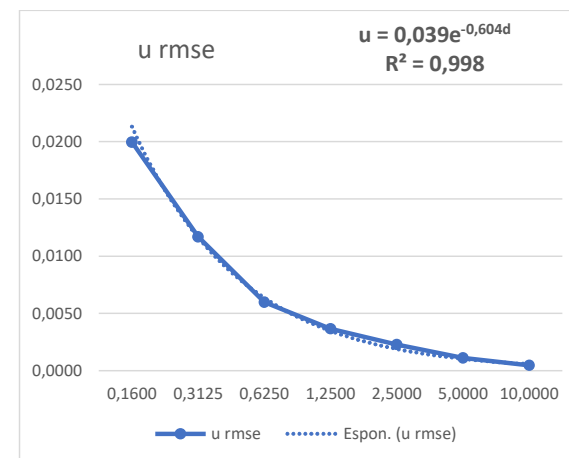
Dai risultati individuati dall'algorithm di ottimizzazione è anche emerso che u_c (valore max dell'effetto $U_a(t)$) e δ sono in relazione fra loro, ossia l'effetto massimo u_c della doxorubicina dipende dalla dose secondo una legge esponenziale negativa:



500 cellule

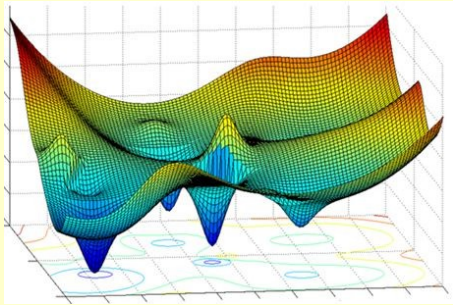


2000 cellule



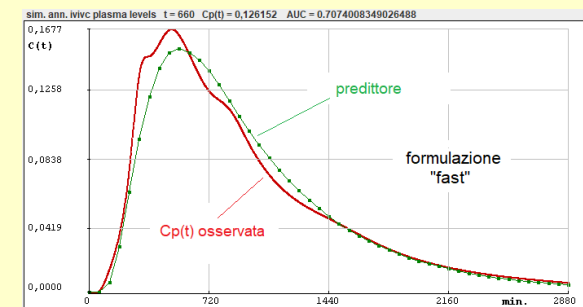
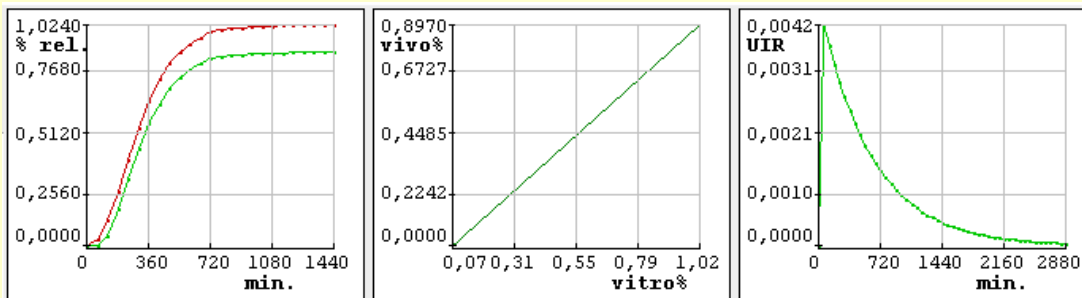
4000 cellule

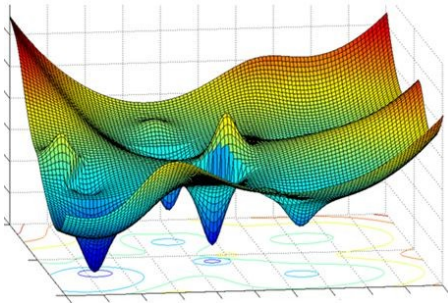
Quindi u_c (effetto max del farmaco) diminuisce all'aumentare della dose δ qualsiasi sia la dimensione dello sferoide.



In Vitro - In Vivo Correlation

(modelli matematici, funzione costo numerica, simulazioni, validazione modelli, risultati migliori)





IVIVC

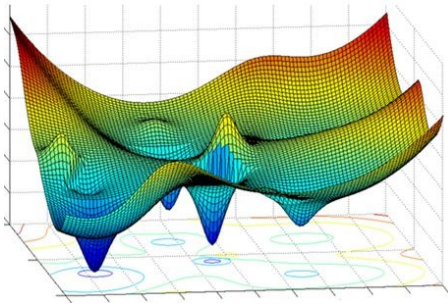


www.bsideitalia.it

Biowaiver

- se gli eccipienti del medicinale equivalente sono uguali a quelli del medicinale di marca ("originator")
- se (ad es. per trasposizione di scala, per modifiche processo produttivo, diverse caratteristiche di un eccipiente, ecc.) viene modificata la formulazione di un medicinale già autorizzato
- se, rispetto agli studi clinici, occorre modificare la formulazione per consentire la produzione industriale del medicinale

allora, per l'iter autorizzativo del medicinale, si può dimostrare solo una equivalenza in vitro (test di dissoluzione) oltre a dimostrare che il *principio attivo* soddisfa i requisiti standard di purezza, qualità, identità e potenza stabiliti dagli enti regolatori (es. EMA, FDA, ...).

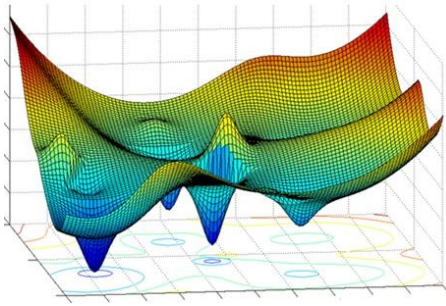


IVIVC

Spesso si può dimostrare che esiste una relazione fra l'andamento temporale del rilascio in vitro e quello dell'assorbimento in vivo.

FDA: la correlazione *in vitro* - *in vivo* è un modello matematico che predice la risposta in-vivo (es. la concentrazione plasmatica) a partire dalle proprietà dimostrate in-vitro (es. tasso di principio attivo rilasciato dalla forma farmaceutica).

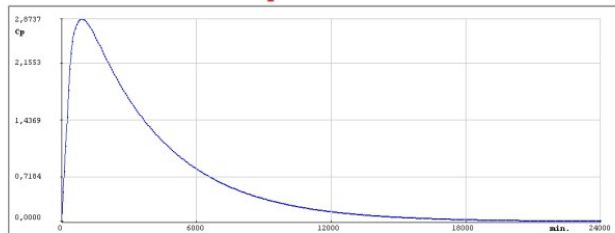
L'IVIVC è molto utile anche per lo sviluppo, l'ottimizzazione e la fabbricazione delle forme farmaceutiche solide, oltre che per richiedere il *procedimento autorizzativo biowaiver* per i nuovi medicinali (o per modifiche su quelli già autorizzati).



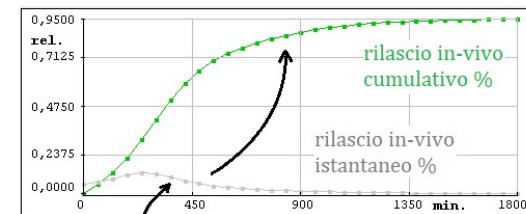
IVIVC

- dalla concentrazione plasmatica osservata e da un modello PK noto (ma con i suoi parametri ignoti) per il corpo umano, si stima l'andamento temporale del rilascio in vivo
- con il rilascio in vivo (stimato) e quello in vitro (misurato) si stabilisce l'IVIVC, ossia si identifica una funzione matematica per correggere il rilascio in vitro al fine di predire la concentrazione plasmatica a seguito di un'ipotetica somministrazione

concentrazione plasmatica del farmaco

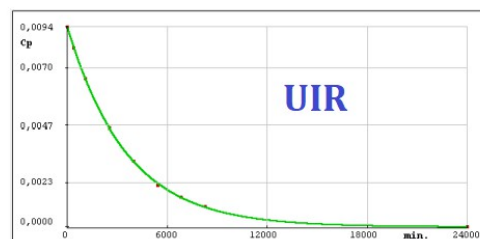


1° stadio



deconvoluzione

$x[n]$ rilascio in-vivo
del farmaco dalla
forma farmaceutica

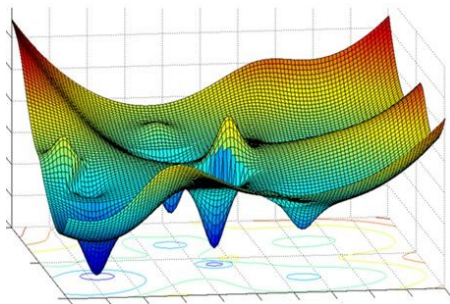


dose_{iv}
assorbimento
istantaneo
a $t = 0$

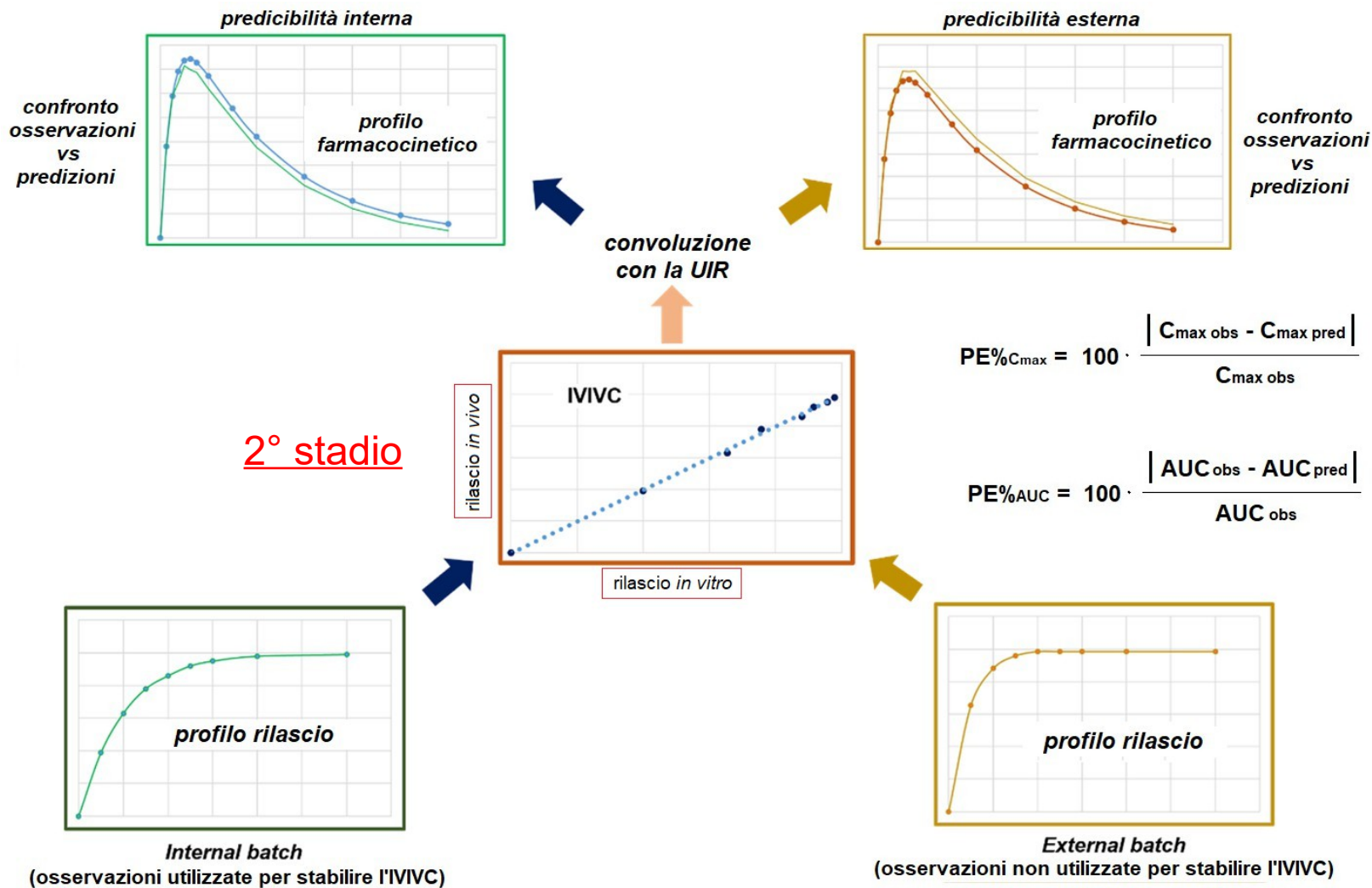
$$\begin{matrix} Q_{\text{body}} \\ C_p = \frac{Q_{\text{body}}}{V_d} \end{matrix}$$

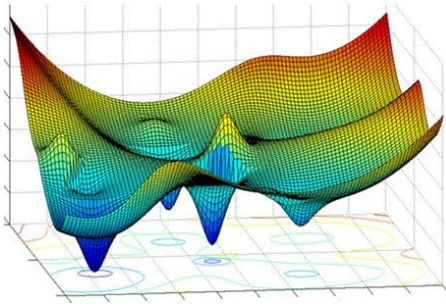
$k_e Q_{\text{body}}$

modello PK



IVIVC





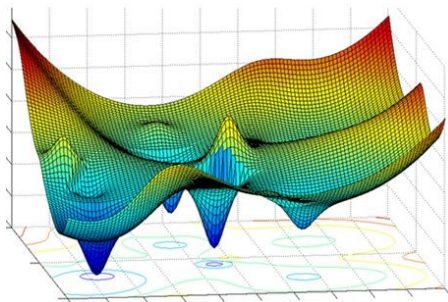
IVIVC

Non è richiesto che sia seguito un particolare metodo per stabilire l'IVIVC ma esistono dei requisiti che il modello deve avere, ad es. [<https://www.fda.gov/media/70939/download>]

- Average absolute percent prediction error (% PE) of 10% or less for C_{\max} and AUC establishes the predictability of the IVIVC. In addition, the % PE for each formulation should not exceed 15%.
- % PE of 10% or less for C_{\max} and AUC establishes the external predictability of an IVIVC.
- % PE between 10 - 20% indicates inconclusive predictability and the need for further study using additional data sets. Results of estimation of PE from all such data sets should be evaluated for consistency of predictability.
- % PE greater than 20% generally indicates inadequate predictability, unless otherwise justified.

Gli approcci “classici” (es. deconvoluzione) mostrano limiti che possono essere superati impiegando gli algoritmi di *Intelligenza Computazionale*.

Verranno così trovate soluzioni migliori perché ottenute come risultato di un processo di ottimizzazione mirato al soddisfacimento dei requisiti.



IVIVC

Studio IVIVC condotto su tre compresse di tipo ER (Extended Release) con differente velocità di rilascio del principio attivo: slow, medium, fast.

i valori in **rosso** non sono ritenuti accettabili

1 compartimento

"fast" 1PK_IR	observed	predicted	PE% sim. ann.
C _{max}	0,167670	0,155091	7,50
AUC _{last}	2,713624	2,656942	2,09
"medium" 1PK_IR	observed	predicted	PE% sim. ann.
C _{max}	0,127189	0,132906	4,49
AUC _{last}	2,643610	2,515429	4,85
"slow" 1PK_IR	observed	predicted	PE% sim. ann.
C _{max}	0,103310	0,111164	7,60
AUC _{last}	2,261735	2,213846	2,12

2 compartimenti

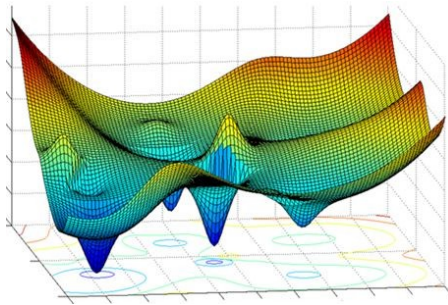
"fast" 2PK_IR	observed	predicted	PE% sim. ann.
C _{max}	0,167670	0,153416	8,50
AUC _{last}	2,713624	2,702520	0,41
"medium" 2PK_IR	observed	predicted	PE% sim. ann.
C _{max}	0,127189	0,134031	5,38
AUC _{last}	2,643610	2,556337	3,30
"slow" 2PK_IR	observed	predicted	PE% sim. ann.
C _{max}	0,103310	0,110243	6,71
AUC _{last}	2,261735	2,248130	0,60

simulated annealing

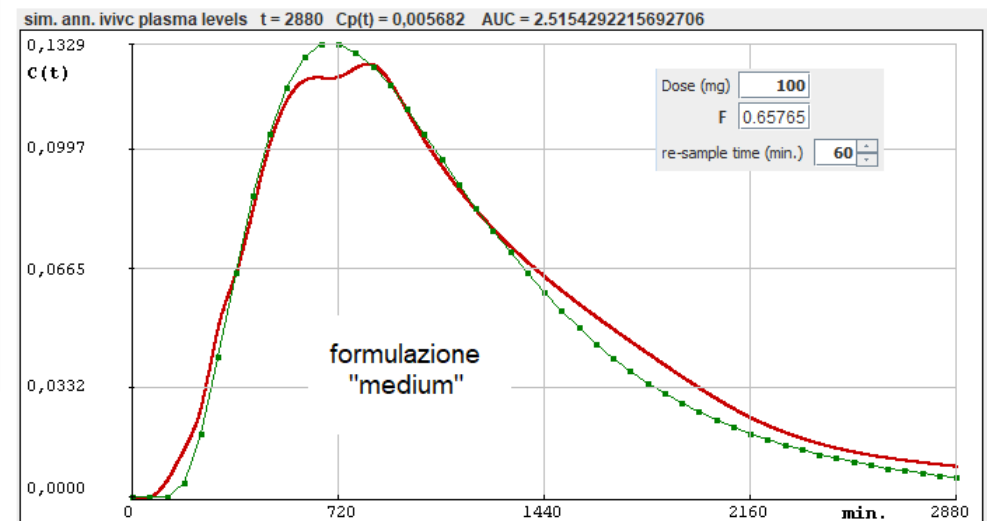
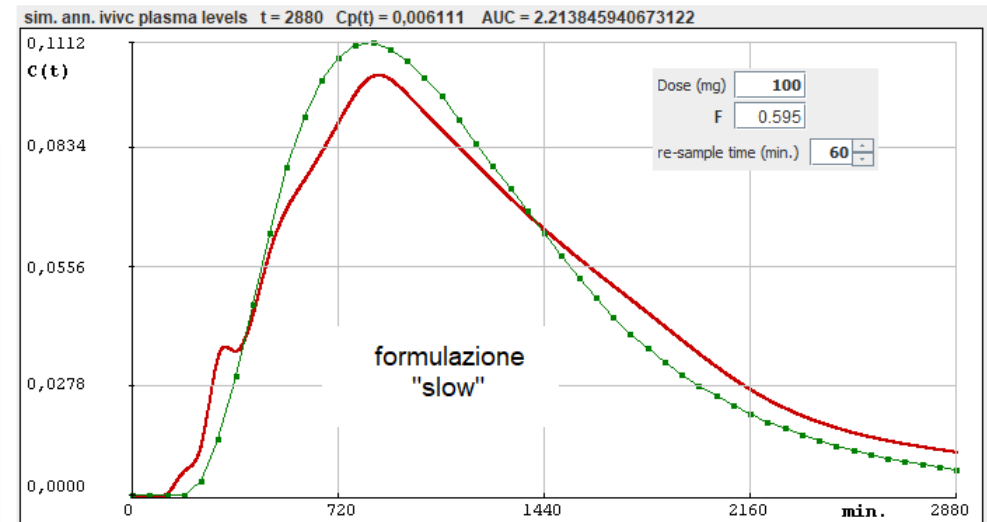
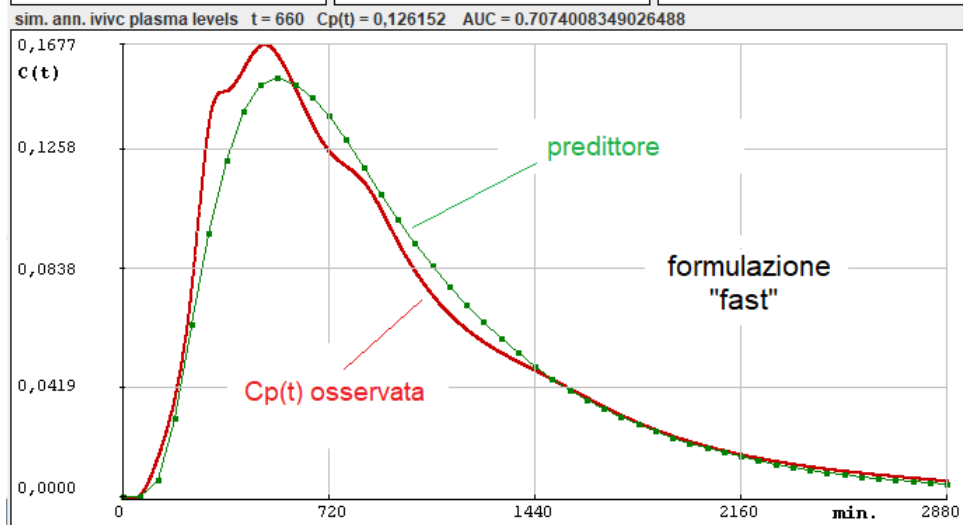
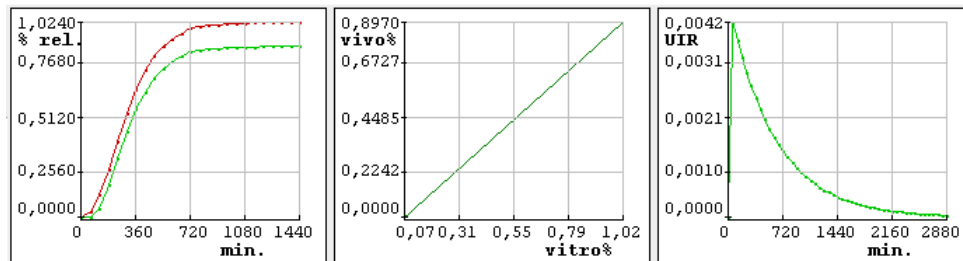
PE% SD con UIR	PE% SD no UIR
8,70	10,70
11,20	8,80
PE% SD con UIR	PE% SD no UIR
0,85	1,00
11,10	8,60
PE% SD con UIR	PE% SD no UIR
15,50	15,40
0,64	2,20
PE% SD con UIR	PE% SD no UIR
11,50	9,50
9,30	9,20
PE% SD con UIR	PE% SD no UIR
3,10	1,30
9,20	9,20
PE% SD con UIR	PE% SD no UIR
13,00	14,90
1,40	1,50

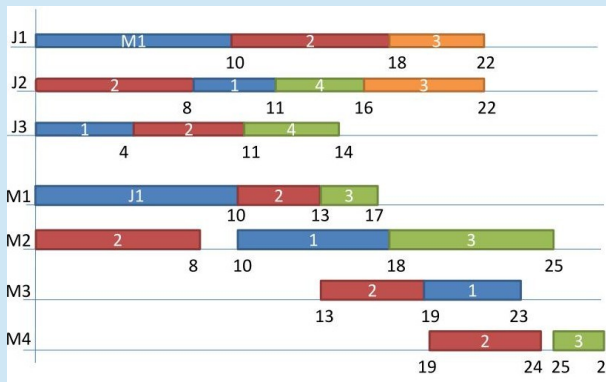
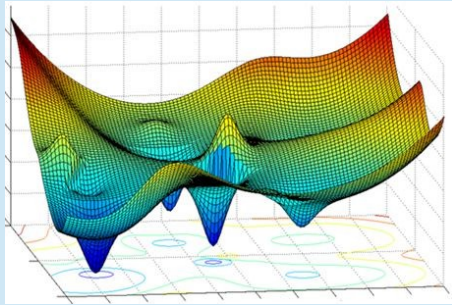
deconvoluzione numerica

PE% ND
12,60
3,40
PE% ND
3,30
3,90
PE% ND
13,10
7,20
PE% ND
12,60
3,40
PE% ND
3,30
3,90
PE% ND
13,10
7,20



IVIVC





www.bsideitalia.it

grazie

Dott. Ing. Paolo Gentili
p.gentili@bsideitalia.it
 tel. +39 347 6638766

