



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

**“SVILUPPO DI UN MODELLO DI
SIMULAZIONE DELLA
FARMACOCINETICA/FARMACODINAMICA
DELLA DOXORUBICINA IN CELLULE DI
MIELOMA MULTIPLO”**

Relatore: Prof. Roberto Visentin

Laureando: Luca Grigolin

ANNO ACCADEMICO 2023 –2024

Data di laurea 21/11/2023

Riassunto

Il Mieloma Multiplo è una forma tumorale del sangue che ha origine nelle cellule plasmatiche del midollo osseo. Al giorno d'oggi, rimane un tumore non curabile ma gestibile, ad esempio attraverso approcci terapeutici come la chemioterapia, mirati a rallentare la progressione della malattia e alleviare i sintomi per migliorare la qualità di vita dei pazienti.

In tale contesto, i modelli di farmacocinetica (PK) e farmacodinamica (PD) rivestono un ruolo fondamentale, in quanto permettono di generare predizioni dell'effetto del farmaco nell'ottica di scegliere una terapia più efficace, al contempo, permettono di "scovare" terapie alternative, equivalenti, ma con tossicità minore.

Questa tesi ha lo scopo di sviluppare un modello matematico PK/PD che permetta di simulare diversi regimi di dosaggio di Doxorubicina, un farmaco chemioterapico impiegato per il trattamento del Mieloma Multiplo. Ciò è realizzato a partire da singoli modelli PK e PD precedentemente sviluppati. Tali modelli sono stati opportunamente modificati e integrati in una struttura unica in grado di simulare diversi profili di cinetica e dinamica in risposta ad un determinato regime di trattamento (definito da un preciso dosaggio, tempo di esposizione e frequenza di somministrazione di un farmaco).

Il modello PK/PD ottenuto è stato inizialmente validato generando simulazioni di singoli dosaggi e confrontandole, con successo, con quelle dei modelli di partenza. In seguito, sono stati forniti diversi casi di studio, a titolo esemplificativo, testando diversi regimi di trattamento durante un mese di simulazione, variando quindi frequenze, dosaggi e tempi di esposizione, per apprezzare l'impatto dei diversi fattori in termini di effetto farmacodinamico corrispondente. Un modello PK/PD sarà in grado di fornire informazioni utili su un determinato regime di trattamento farmacologico è di fondamentale importanza per fornire supporto decisionale alla personalizzazione delle terapie antitumorali in pazienti affetti da mieloma multiplo.

Indice

CAPITOLO 1 – Introduzione	5
1.1 Trattamenti per il Mieloma Multiplo	5
1.2 Modelli di Farmacocinetica e Farmacodinamica	6
1.3 Scopo della Tesi	6
CAPITOLO 2 – Modelli di Farmacocinetica e Farmacodinamica della Doxorubicina ...	7
2.1 Modello di Farmacocinetica	7
2.1.1 Struttura Compartmentale ed Equazioni del Modello	8
2.1.2 Identificazione e Simulazione del Modello PK	10
2.2 Modello di Farmacodinamica	13
2.2.1 L’equazione Differenziale	13
2.2.2 Identificazione e Simulazione del Modello PD	14
CAPITOLO 3 – Modello di Farmacocinetica/Farmacodinamica	19
3.1 Modello di Farmacocinetica aggiornato	19
3.2 Modello di Farmacodinamica aggiornato	20
3.2.1 k_d dipendente dalla concentrazione bound puntuale	20
3.2.2 k_d dipendente dalla concentrazione bound tempo-variante	22
CAPITOLO 4 – Casi di Studio	23
4.1 Simulazioni di singoli dosaggi	25
4.2 Simulazioni di dosaggi ripetuti	27
4.2.1 Effetto della frequenza di somministrazione	27
4.2.2 Effetto del diverso dosaggio	29
4.2.3 Effetto del tempo di esposizione	31
CONCLUSIONI	33
CODICI MATLAB	34
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	43

Capitolo 1.

Introduzione

Il mieloma multiplo (MM) conosciuto anche come la malattia di Kahler-Bozzolo è una neoplasia sostenuta da un clone tumorale di natura plasmacellulare, ovvero di cellule appartenenti al sistema immunitario e quindi responsabili della produzione di anticorpi, localizzate maggiormente nel midollo osseo [1]. Pertanto, il MM rientra nella tipologia di tumori ematici e linfatici. Il MM si sviluppa solitamente in pazienti con un'età media di 70 anni ed è presente per il 18% in pazienti più giovani dei 50 anni [2]. A causa dell'invecchiamento della popolazione globale, la sua incidenza è aumentata del 126% dal 1990 al 2016 [2]. Al giorno d'oggi, il MM rimane un cancro trattabile ma non curabile, con alto rischio di morte.

1.1. Trattamenti per il Mieloma Multiplo

Al giorno d'oggi il mieloma multiplo (MM) viene trattato con una combinazione di trattamenti di natura diversa, prescritti secondo il paziente stesso e l'evoluzione della sua malattia. Tra questi trattamenti troviamo l'immunoterapia, in cui si utilizza il sistema immunitario stesso per eliminare le cellule cancerogene, la somministrazione di farmaci chemioterapici, la somministrazione di farmaci biologici, tra cui i farmaci immunomodulanti, la radioterapia e il trapianto di cellule staminali [1]. Tra i farmaci chemioterapici disponibili, la Doxorubicina (DOXO) è quella che più frequentemente viene utilizzata nei trattamenti. Si tratta di un farmaco che viene impiegato con successo anche nei trattamenti di tumore al seno o alle ovaie, la cui efficacia, specialmente in caso di dosi abbondanti, va a pari passo con possibili effetti collaterali quali l'insufficienza cardiaca, la mielosoppressione, le infezioni e il rischio di recidiva [3]. Pertanto, riuscire a ottimizzare il regime di dosaggio in modo da massimizzare l'efficacia del farmaco e minimizzare la sua tossicità rappresenta un problema di fondamentale importanza.

1.2. Modelli di Farmacocinetica e Farmacodinamica

I modelli matematici di farmacocinetica (PK) e di farmacodinamica (PD) permettono di descrivere come un farmaco, a seguito di una sua somministrazione all'interno di un organismo, si distribuisce nello stesso e l'effetto che ne provoca. Questi modelli si sono rivelati molto utili per realizzare nuovi protocolli di terapia per il trattamento del tumore al seno [4]. Tuttavia, ma per quanto concerne il mieloma multiplo la ricerca è ancora agli stadi iniziali.

Nello specifico, nel capitolo successivo verranno illustrati due modelli che descrivono, rispettivamente, PK e PD di DOXO a partire da esperimenti *in vitro* condotti in cellule di MM [4] [5].

Tuttavia, ad oggi questi due modelli non interagiscono tra loro, e pertanto non è possibile impiegarli all'interno di un software di simulazione per supportare l'ottimizzazione del trattamento.

1.3. Scopo della Tesi

Lo scopo della tesi è quello di integrare i due modelli PD e PK in un unico modello PK/PD, in grado di predire l'effetto di trattamenti chemioterapici con DOXO a differenti regimi di dosaggio e ripetizioni qualsiasi lungo il tempo.

Nei capitoli successivi, verrà fornita dapprima una descrizione dettagliata dei modelli PK e PD di DOXO impiegati (Capitolo 2), la strategia impiegata per realizzarne la loro interazione (Capitolo 3), un serie di casi di studio e le loro relative simulazioni (Capitolo 4).

Capitolo 2.

Modelli di Farmacocinetica e Farmacodinamica della Doxorubicina

In questo capitolo vengono descritti due modelli, rispettivamente di farmacocinetica e di farmacodinamica di DOXO, i cui parametri sono già stati stimati in ricerche precedenti [4] [5]. Tali modelli descrivono la distribuzione di DOXO all'interno di cellule di MM e l'effetto sulle stesse, a seguito della somministrazione di una dose specifica di DOXO in esperimenti *in vitro*. La coltura presa in esame è la linea cellulare umana MMR1 prelevata dal sangue periferico di un paziente MM di 42 anni divenuto resistente alla terapia a base di steroidi (dati ottenuti dall'American Type Data Collection) [4]. La tecnica utilizzata per la somministrazione del farmaco è la deposizione nel mezzo di coltura al tempo $t_0 = 0 h$, mentre la rimozione di DOXO viene realizzata attraverso il media replacement al termine del tempo di somministrazione $t_s = 3 h$.

2.1. Modello di Farmacocinetica

La DOXO, conosciuta anche come Adriamicina è una molecola (formula bruta: $C_{27}H_{29}NO_{11}$) che una volta trovata nel nucleo della cellula, si inserisce tra le basi dei filamenti di DNA bloccando i normali processi di trascrizione [3], e stabilizza un particolare enzima, l'enzima Topoisomerasi di Tipo 2, responsabile del districamento dei filamenti di DNA nei processi di divisione cellulare che in sua mancanza risulterebbero tutti aggrovigliati e renderebbero impossibile la separazione. Il risultato complessivo della sua azione corrisponde ad una rottura della doppia elica di DNA [6], e conseguentemente alla morte cellulare. Prima di giungere al

nucleo, la DOXO entra nella cellula tramite processo diffusivo, attraverso portatori saturabili, può venire espulsa via P-Glicoproteine, che risiedono nella membrana cellulare, e utilizzando ATP espelle sostanze esterne [7], tra cui anche la DOXO somministrata. Per descrivere la PK di DOXO si impiega dunque un modello compartimentale, che descriva al meglio i flussi di doxorubicina tra i vari compartimenti cellulari.

2.1.1. Struttura Compartimentale ed Equazioni del Modello

La struttura compartimentale del modello è riportata in Figura 2.1. Essa è suddivisa tra il compartimento esterno, che ha come variabile di stato la concentrazione della DOXO nell'ambiente extracellulare (X_E) ed il compartimento interno, che ha come variabile di stato la concentrazione della DOXO nell'ambiente intracellulare (X_I). L'interno della cellula è suddiviso a sua volta in invece in due ulteriori compartimenti "fittizi", uno che descrive la concentrazione di DOXO libera, non legata al DNA (X_F) e l'altro che rappresenta la concentrazione di DOXO legata al nucleo (X_B o concentrazione bound) e quindi responsabile della rottura della doppia elica.

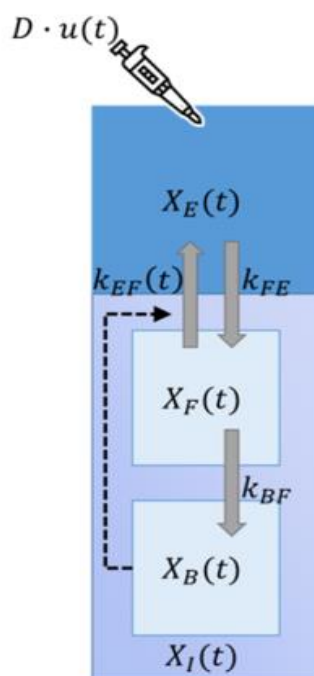


Figura 2.1. Schema del modello di farmacocinetica della doxorubicina (DOXO). D (nM) rappresenta la dose di DOXO somministrata al tempo $t = 0$; X_E , X_I , X_F , X_B , (nM), rappresentano la concentrazione di

DOXO, rispettivamente nello spazio extracellulare e intracellulare (diviso in citoplasma e nucleo, dove il farmaco si lega al DNA); k_{FE} , k_{BF} (hr^{-1}), sono costanti di trasferimento e $k_{EF}(t)$ (hr^{-1}) è un parametro tempo-variante dipendente da X_B . Questo è il modello compartimentale adottato per simulare la cinetica del farmaco.

Allo schema di Figura 2.1 corrisponde il seguente sistema di equazioni differenziali (2.1) che regolano il flusso di DOXO tra i tre compartimenti:

$$\begin{cases} \frac{dX_E(t)}{dt} = k_{EF}(t) \frac{V_I}{V_E} X_F(t) - k_{FE} X_E(t) + u(t) \\ \frac{dX_F(t)}{dt} = k_{FE} \frac{V_E}{V_I} X_E(t) - k_{EF}(t) X_F(t) - k_{BF} X_F(t) \\ \frac{dX_B(t)}{dt} = k_{BF} X_F(t) \end{cases} \quad (2.1)$$

dove V_I e V_E sono rispettivamente il volume intracellulare ed extracellulare (misurati empiricamente e pari a $V_I = 0.0575 \mu\text{L}$ e $V_E = 100 \mu\text{L}$), k_{FE} e k_{EF} (hr^{-1}) sono le costanti di velocità dallo spazio extracellulare all'intracellulare libero e viceversa, k_{BF} (hr^{-1}) è la costante di velocità dallo stato di libertà all'interno della cellula allo stato di legame al DNA della cellula, e $u(t)$ è l'ingresso, descritto come segue:

$$u(t) = \begin{cases} D \cdot \delta(t) & \text{se } t = 0 \\ 0 & \text{altrimenti} \end{cases} \quad (2.2)$$

dove D è la dose di DOXO somministrata.

In particolare, k_{EF} segue un comportamento descritto dalla funzione di Hill (2.3), per tener conto del fenomeno di farmacoresistenza proporzionale alla concentrazione di DOXO legata al DNA:

$$k_{EF}(t) = \frac{V_{max} X_B(t)}{K_{th}^2 + X_B(t)^2} \quad (2.3)$$

con K_{th} (nM) corrispondente al valore di X_B tale per cui il flusso in uscita dalla cellula è pari al 50% del suo valore di saturazione V_{max} (nM/hr).

2.1.2. Identificazione e Simulazione del Modello PK

Come riportato in dettaglio nello studio [4], il modello di PK di DOXO è stato identificato fittando i dati di concentrazione intracellulare del farmaco a seguito di una somministrazione in cellule MM1R a dosaggi di 200 nM e 450 nM per 3 ore (fase di uptake) e per 5 ore successive la rimozione del farmaco stesso (fase di release).

Il vettore dei parametri incogniti $\theta = [k_{FE}, V_{max}, k_{th}, k_{BF}]$ è stato stimato mediante stimatore a massima verosimiglianza a posteriori (MAP) ottenendo le seguenti stime con relative incertezze (Standard Deviation) e precisioni (Coefficienti di Variazione Percentuali, CV) [4].

Cell line	k_{FE} (10^{-4} hr $^{-1}$)	V_{max} (10^5 hr $^{-1}$)	K_{th} (nM)	k_{BF} (hr $^{-1}$)
MM1R	5.06 ± 0.39 (7.72%)	1.55 ± 0.20 (12.92%)	1754.50 ± 52.27 (2.98%)	1.15 ± 0.09 (7.71%)

Tabella 2.1. Valori stimati dei parametri incogniti $\theta = [k_{FE}, V_{max}, K_{th}, k_{BF}]$ su misurazioni effettuate in cellule appartenenti alla linea cellulare MM1R mediante MAP e con le relative incertezze e coefficienti di variazione percentuali (CV) [4].

Avendo a disposizione le stime dei parametri, è possibile impiegare il modello per simulare il profilo di PK di DOXO a seguito di un determinato regime di trattamento (dosaggio del farmaco e tempo di esposizione). Ciò equivale a risolvere le equazioni differenziali (2.1). Ai fini del calcolo, l'effetto dell'ingresso $u(t)$ a condizioni iniziali nulle (ovvero la situazione dell'esperimento in vitro) può essere sostituito perfettamente da un ingresso nullo e condizioni iniziali non nulle, ovvero fissando la concentrazione $X_E(0^-) = X_E(0^+) = D$.

Operativamente, è stata sviluppata in ambiente Matlab una *function* "DOXO_PK.m" (mostrata in dettaglio nei Codici Matlab) contenente le equazioni differenziali, opportunamente integrate tramite solutore *ode45*, implementato all'interno dello script Matlab "Simulate_DOXO_PK.m" (mostrato in dettaglio nei Codici Matlab). È quindi possibile eseguire una simulazione impostando le stesse condizioni sperimentali dello studio *in vitro*, ossia una durata totale dell'esperimento di 8 ore, una somministrazione di DOXO a 200 nM e 450 nM e rimozione della stessa dopo 3 ore di esposizione [4]. Nello specifico, per ricreare la rimozione del farmaco, dopo tre ore di simulazione, le condizioni del sistema sono state forzate ad avere una concentrazione extracellulare nulla, equivalente alla condizione di rimozione di DOXO attraverso media replacement.

Come possibile osservare in Figura 2.2, le simulazioni ottenute ricalcano fedelmente i risultati dello studio precedente (Figura 2.3). Inoltre, è possibile osservare i contributi di DOXO libera e nel nucleo che vanno a costituire la concentrazione intracellulare totale.

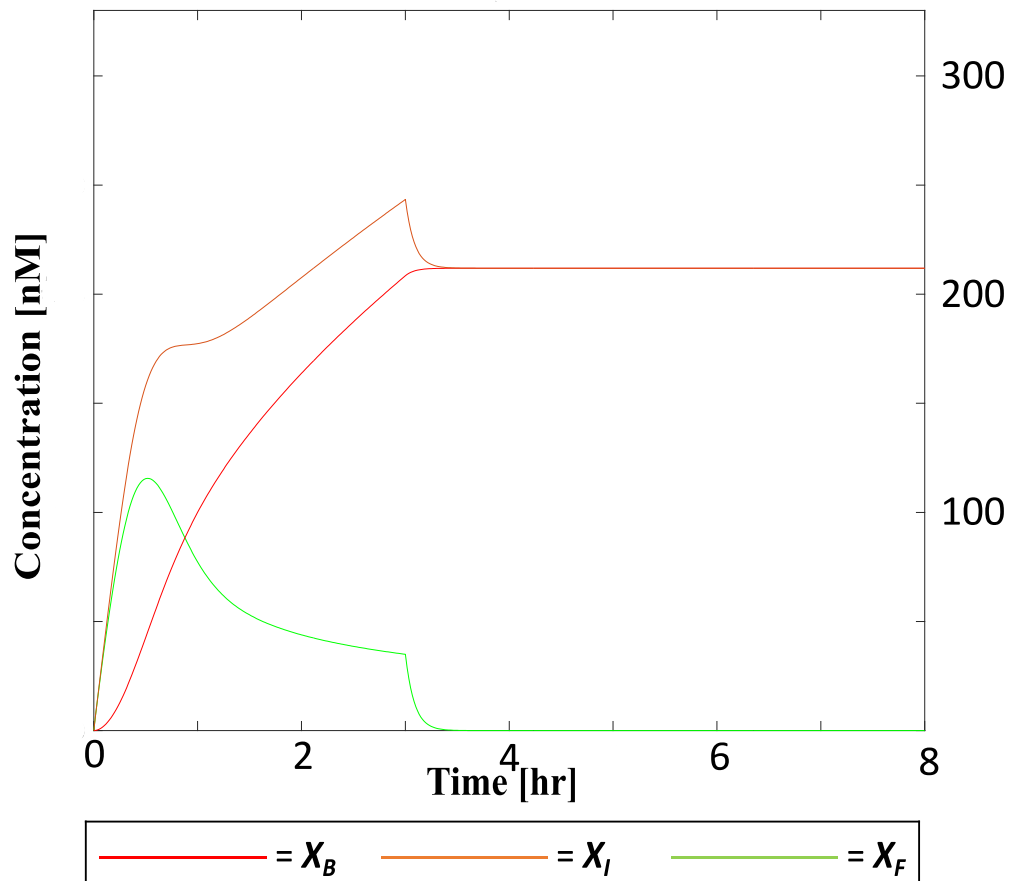


Figura 2.2. Simulazione di farmacocinetica (PK) effettuata da "PK_MODEL.m" per un dosaggio di 450 nM di DOXO. Il tempo di somministrazione è di tre ore. In arancione vi è l'andamento della concentrazione interna X_I rispetto al tempo, mentre in rosso e verde quella bound e free rispettivamente.

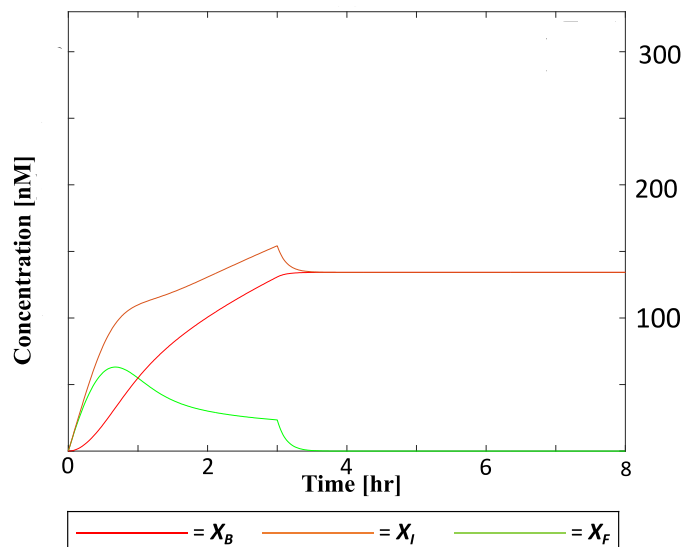


Figura 2.3. Simulazione di farmacocinetica (PK) effettuata da "PK_MODEL.m" per un dosaggio di 200 nM di DOXO. Il tempo di è di tre ore. In arancione vi è l'andamento della concentrazione interna X_I rispetto al tempo, mentre in rosso e verde quella bound e free rispettivamente.

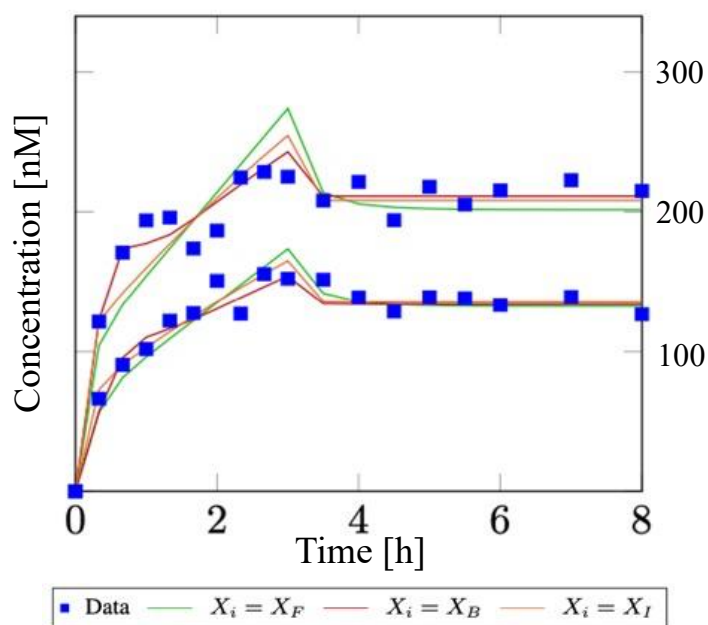


Figura 2.4. I risultati della ricerca precedente [4], comprendenti i dati misurati della concentrazione del farmaco all'interno della cellula, rappresentati da quadratini blu, e, in rosso, per $X_i = X_B$ troviamo i grafici rispetto al tempo della predizione della concentrazione intracellulare X_I del modello assunto per (2.1) (2.3), i grafici verdi e arancioni assumono invece modelli con l'equazione (2.3) modificata e

quindi non sono d'interesse. Il grafico superiore è prodotto da un dosaggio di 450 nM di DOXO ed invece quello inferiore per 200 nM, per entrambi tempo di somministrazione è di 3 ore.

2.2. Modello di farmacodinamica

Dal punto di vista farmacodinamico, la DOXO agisce sulla coltura *in vitro* riducendo la crescita esponenziale che avverrebbe in condizioni normali, il modello adottato è una versione semplificata di una crescita logistica e risposta al trattamento già utilizzati nello studio per il tumore al seno, e già riproposti in linee cellulari [5]. Si adotterà lo stesso modello PD utilizzando le stime della ricerca già effettuata, e si genererà una simulazione tramite *ode45* che fornirà grafici che si confronteranno con i dati misurati e le previsioni della ricerca precedente.

2.2.1 L'equazione Differenziale

L'equazione differenziale che determina la crescita logistica della popolazione cellulare è la seguente:

$$\frac{dN}{dt} = (k_p - k_d) * N * \left(1 - \frac{N}{\theta}\right) \quad (2.4)$$

ove si suppone un N_0 iniziale corrispondente al numero di cellule iniziale nella coltura. I parametri k_d e k_p sono i reali contribuenti nella dinamica della popolazione, rispettivamente il parametro di morte e proliferazione cellulare, mentre θ rappresenta il valore di saturazione. Nello specifico, k_d dipende dal dosaggio di DOXO somministrato e segue un modello esponenziale descritto dall'equazione (2.5):

$$k_d = A * \left(1 - e^{-\frac{dose}{B}}\right) \quad (2.5)$$

Dall'equazione (2.5) possiamo notare come k_d cresca esponenzialmente con il dosaggio somministrato (dose), inoltre, i due parametri A e B sono i coefficienti dell'equazione, misurati rispettivamente in hr^{-1} e nM, necessitano di essere stimati, ciò verrà effettuato nel sotto capitolo successivo.

2.2.2 Identificazione e Simulazione del Modello PD

Come riportato in dettaglio nello studio [5], l'identificazione del modello PD comprende vari step. Prima di tutto si è identificato il modello (assumendo k_d nullo) fittando dati di controllo, in assenza di trattamento, in modo da stimare, tramite stimatore a massima verosimiglianza a posteriori (MAP), i parametri incogniti θ e k_p , poiché la saturazione della crescita di popolazione e il parametro di nascita sono assunti indipendenti dall'effetto della DOXO per lasciare, dunque, che il parametro di morte k_d modelli tutto l'effetto del farmaco.

Parametro	Stima	CV
θ [dimensionless]	248512	4.65%
k_p [hr ⁻¹]	0.0342	11.69%

Tabella 2.2. Valori stimati dei parametri θ , k_d , con i relativi CV, sul modello lineare assunto dall'equazione 2.4 su cellule appartenenti alla linea cellulare MM1R in assenza di dosaggio mediante MAP dalla ricerca precedente [5].

Per il parametro di morte k_d , si sono fittati i dati corrispondenti ai dosaggi di 15, 20, 40, 50, 200, 450, 900 nM per 3 ore di somministrazione (fase di uptake) e per 400 ore successive alla rimozione del farmaco mediante media replacement (fase di release) e si è stimato, sempre tramite stimatore MAP, nuovamente il parametro incognito θ , per confrontarlo con quello di controllo, stimato in assenza di DOXO, il numero di cellule iniziale N_0 e ovviamente il parametro incognito k_d . Le stime di tali parametri dalla ricerca precedente [5] sono riportate nella tabella successiva:

DOXO dose [nM]	θ [dimensionless]	N_0 [dimensionless]	k_d [h ⁻¹]
15	236202 (3.99%)	25657 (11.44%)	0.0179 (8.92%)
20	236202 (3.99%)	6355 (16.80%)	0.0208 (5.72%)
40	236202 (3.99%)	23722 (2.80%)	0.0317 (1.48%)
50	236202 (3.99%)	5726 (19.91%)	0.0330 (2.59%)
200	236202 (3.99%)	8039 (12.91%)	0.0482 (3.76%)
450	236202 (3.99%)	3684 (5.07%)	0.0479 (6.19%)
900	236202 (3.99%)	4579 (31.86%)	0.0549 (11.41%)

Tabella 2.3. Valori stimati dei parametri θ , N_0 e K_d sul modello lineare assunto dall'equazione 2.4 rispetto a tutte le dosi sperimentate con i relativi CV, su misurazioni effettuate su cellule appartenenti alla linea cellulare MM1R mediante MAP dalla ricerca precedente [5].

Come si può notare dalla Tabella 2.3, il termine di saturazione θ risulta simile a quello precedente ed ha anche un CV migliore. A questo punto, avendo a disposizione tutte le stime del parametro k_d rispetto ai dosaggi, vengo stimati tramite stimatore MAP anche i parametri A e B , dell' equazione 2.5:

Parametro	Stima	CV
A [hr ⁻¹]	0.05	3.02%
B [nM]	41.65	9.41%

Tabella 2.4. Valori stimati dei parametri *A* e *B* sul modello esponenziale assunto dall'equazione (2.5) con i relativi coefficienti di variazione percentuali (CV), su cellule appartenenti alla linea cellulare MM1R mediante MAP [5].

Avendo a disposizione le stime dei parametri, è possibile impiegare il modello per simulare il profilo di PD di DOXO a seguito di un determinato regime di trattamento (dosaggio del farmaco e tempo di esposizione). Ciò equivale a risolvere le equazioni (2.4),(2.5).

Operativamente, è stata sviluppata in ambiente Matlab una *function* "DOXO_PD.m" (mostrata in dettaglio nei Codici Matlab) contenente le equazioni del modello di farmacodinamica, opportunamente integrate tramite solutore *ode45*, implementato all'interno dello script Matlab "Simulate_DOXO_PD.m" (mostrato in dettaglio nei Codici Matlab). È quindi possibile eseguire una simulazione impostando le stesse condizioni sperimentali dello studio *in vitro*, ossia una durata totale dell'esperimento di 400 ore, una somministrazione di DOXO a 20 nM e 200 nM e rimozione della stessa dopo 3 ore di esposizione [5].

In Figura 2.5 e 2.6 sono riportate le predizioni dello studio precedente [5] assieme alle misurazioni effettuate *in vitro*, accoppiate con le relative simulazioni PD generate.

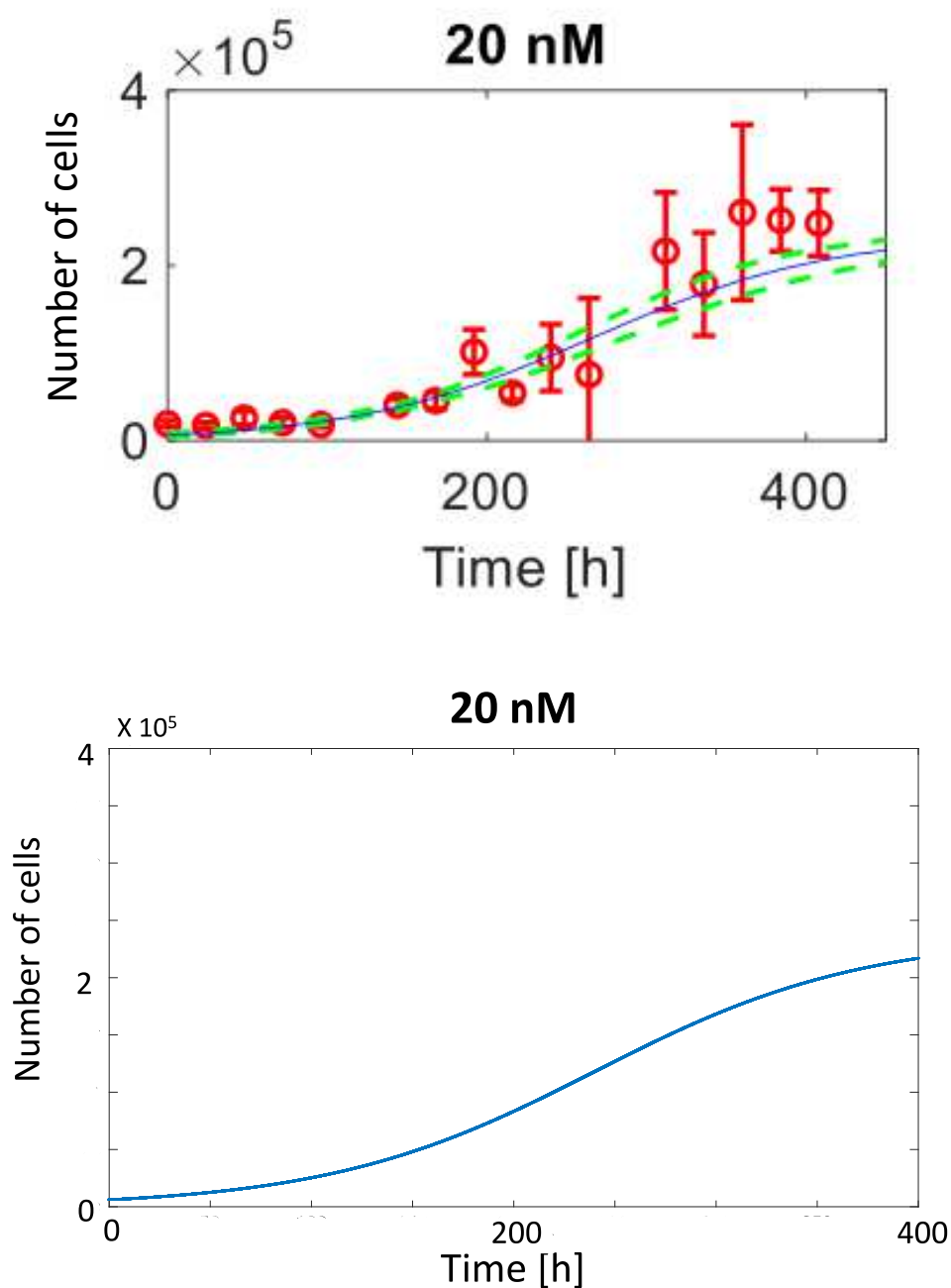


Figura 2.5. Nel primo grafico, in alto, si distinguono le misurazioni effettuate (in rosso) e la predizione del modello (in blu) dalla ricerca precedente [5], su un dosaggio di 20 nM per 3 ore di somministrazione e per le 400 ore successive. Nel secondo, in basso, vi è la predizione di "Simulate_DOXO_PD.m", sottoposto alle medesime condizioni, che risulta identica da quella del primo grafico. In entrambe le figure il numero di cellule iniziale è di 6355 cellule, come si trova in Tabella (2.3).

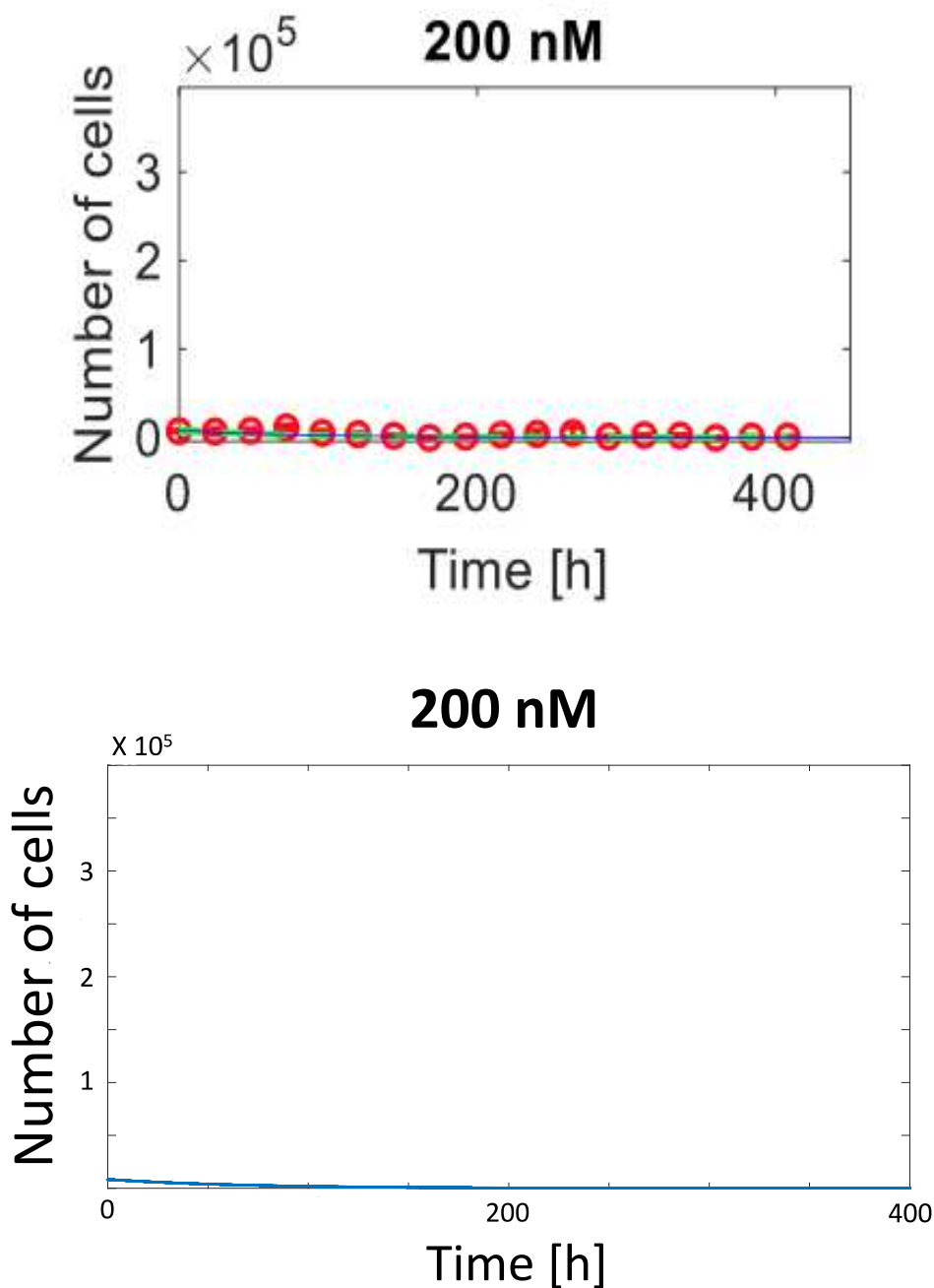


Figura 2.6. Nel primo grafico, in alto, si trovano le misurazioni effettuate (in rosso) e la predizione del modello (in blu) dalla ricerca precedente [5] su un dosaggio di 200 nM per 3 ore di somministrazione e per le 400 ore successive. Nel secondo, in basso, vi è la predizione di "Simulate_DOXO_PD.m", sottoposto alle medesime condizioni, che risulta identica da quella del primo grafico. In entrambe le figure il numero di cellule iniziale è di 8039 cellule, come si trova in Tabella (2.3).

Come possiamo notare dalle figure 2.5 e 2.6, "Simulate_DOXO_PD.m" è in accordo con le misurazioni e predizioni effettuate dalla ricerca precedente [4].

Capitolo 3.

Modello di Farmacocinetica/Farmacodinamica

Questo capitolo tratta l'integrazione dei modelli PK e PD di DOXO in un'unica struttura che permetta la simulazione contemporanea delle cinetiche e degli effetti di un determinato trattamento con DOXO in cellule MM1R. Come spiegato in dettaglio di seguito, ciò viene realizzato implementando una dipendenza temporale del parametro di morte cellulare in modo da legarlo direttamente alla cinetica del farmaco. Viene aggiunto inoltre un parametro che tenga conto della perdita di efficacia del farmaco, in modo da ottenere un comportamento più realistico della cinetica nel lungo periodo. Il modello PK/PD risultante sarà inoltre in grado di simulare anche trattamenti con dosaggi ripetuti.

3.1 Modello di Farmacocinetica aggiornato

In un'ottica di implementazione e simulazione di trattamenti con dosaggi ripetuti, occorre tener presente che l'attuale modello della PK di DOXO non include alcuna perdita di efficacia del farmaco nel tempo; tale limitazione causa un potenziale "add-up" dei dosaggi in un tipico regime di trattamento, suggerendo, a parità di dosaggio, un effetto apoptotico maggiore rispetto alla realtà. Volendo quindi fornire una descrizione modellistica più realistica, l'equazione (2.1) del modello PK descritto nel capitolo 2 è stata modificata come segue:

$$\begin{cases} \frac{dX_E(t)}{dt} = k_{EF}(t) \frac{V_I}{V_E} X_F(t) - k_{FE} X_E(t) + u(t) \\ \frac{dX_F(t)}{dt} = k_{FE} \frac{V_E}{V_I} X_E(t) - k_{EF}(t) X_F(t) - k_{BF} X_F(t) \\ \frac{dX_B(t)}{dt} = k_{BF}(t) X_F(t) - k_{deg} X_B(t) \end{cases} \quad (3.1)$$

Come si può notare, il nuovo sistema di equazioni (3.1) si differenzia dal precedente (2.1) per l'aggiunta di un termine di degradazione proporzionale, tramite un parametro k_{deg} (stimato dai dati dello studio [4] e pari a 0.0082 ore), alla concentrazione di DOXO nel nucleo. Per

realizzare ciò in ambiente Matlab è stata sviluppata una nuova *function* “DOXO_PKnew.m” (mostrata in dettaglio nei Codici Matlab) che verrà invocata in sostituzione di “DOXO_PK.m” dal solutore *ode45* in un nuovo script “Simulate_DOXO_PKPD.m” (mostrato in dettaglio nei Codici Matlab). Il contributo di k_{deg} sulla farmacocinetica di DOXO si traduce in una diminuzione della concentrazione intracellulare del farmaco nel lungo periodo, come ben visibile in Figura 3.1:

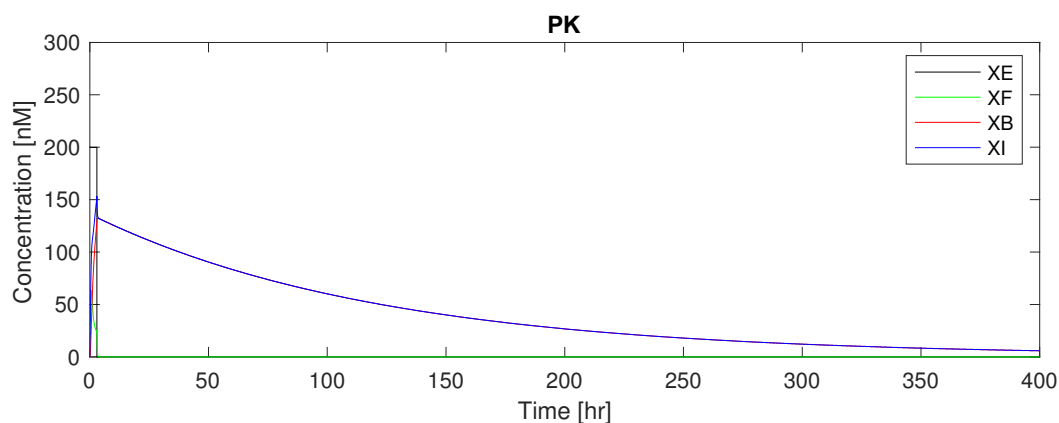


Figura 3.1. Simulazione di una somministrazione di 200 nM di DOXO per 3 ore e lasciata correre per 400 ore ancora, generata dal solutore *ode45* sulla nuova *function* “NEW_DOXO_PK” che implementa la nuova cinetica. Si noti una totale decrescita delle concentrazioni nelle 400 totali della simulazione.

3.2 Modello di Farmacodinamica aggiornato

Al fine di permettere l’interazione tra i modelli PK e PD di DOXO, è stato necessario modificare il parametro k_d che descrive il tasso di morte cellulare. Infatti, il modello di partenza (2.5) è dipendente unicamente dal dosaggio di DOXO somministrato, non anche dal tempo di esposizione. Di contro, è opportuno che k_d sia dipendente dalla quantità di DOXO legata al DNA (che effettivamente contribuisce alla morte della cellula).

3.2.1 K_d dipendente dalla concentrazione bound puntuale

Volendo legare il parametro di morte al valore che X_B raggiunge al termine del trattamento ($t_{treatment_end} = 3h$), mantenendo un modello esponenziale, per prima cosa, modifichiamo l’equazione 2.5 come segue:

$$k_d = C * \left(1 - e^{-\frac{X_B(t_{treatment_end})}{D}} \right) \quad (3.2)$$

I parametri del modello aggiornato, C e D , sono stati stimati, utilizzando il software Matlab *lsqnonlin*, identificando il modello stesso sui valori di k_d stimati in funzione della dose di

DOXO (Tabella 2.3), e assumendo come ingresso noto del sistema (funzione forzante) le concentrazioni di X_B al termine della somministrazione, ottenute simulando la farmacocinetica di DOXO assumendo i dosaggi riportati in Tabella 2.3. Per capire graficamente quanto varia il valore della concentrazione bound X_B rispetto al valore del dosaggio effettuato, si è realizzato il seguente grafico:

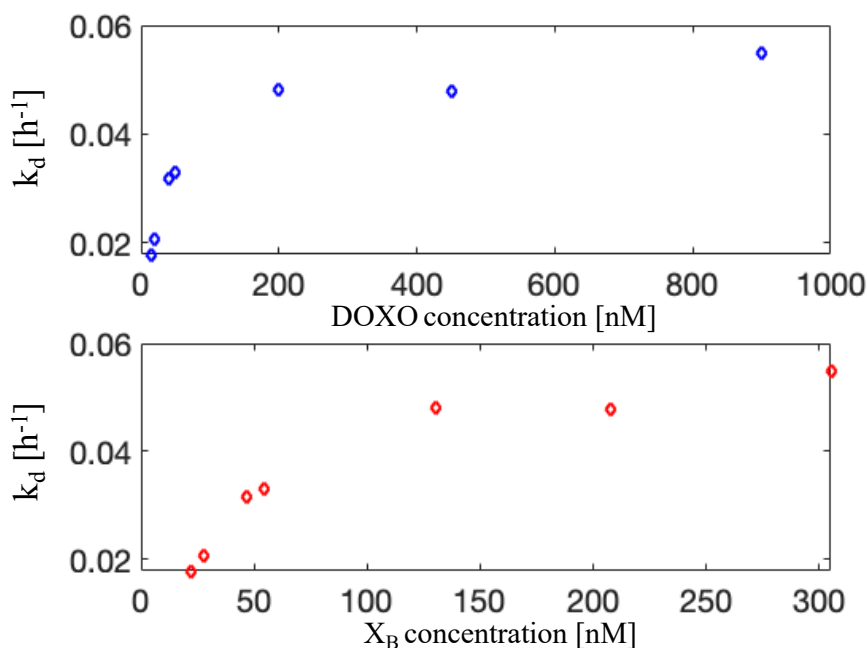


Figura 3.2. Grafici rappresentanti i valori di k_d stimati nella ricerca [5] sui valori dei dosaggi corrispondenti (Tabella 2.3), nel grafico inferiore, in quello superiore gli stessi valori di k_d su i valori che assume la concentrazione bound al termine del tempo di somministrazione.

Le stime dei valori di C e D sono state effettuate nello script Matlab “DEATHRATE_NEW_ESTIMATES.m” (riportato in dettaglio nei Codici Matlab) e sono state stimate con buona precisione, come si può vedere nella tabella successiva; inoltre, è interessante notare come, rispetto al modello precedente, il valore di C sia abbastanza simile alla stima di A , mentre D appare un ordine di grandezza inferiore rispetto a B , consistentemente con le differenze tra i valori di dosi somministrate e concentrazioni X_B esplorate.

Parametro	Stima	CV
C [hr ⁻¹]	0.036	22.364%
D [nM]	4.184	0.234%

Tabella 3.1. Valori stimati dal software *lsqnonlin* dei parametri **C** e **D** sul modello esponenziale assunto dall'equazione (3.2) con i relativi coefficienti di variazione percentuale (CV) dallo script "DEATHRATE_NEW_ESTIMATES.m", sviluppato in ambiente Matlab.

3.2.2 k_d dipendente dalla concentrazione bound tempo-variante

Dalle simulazioni di farmacocinetica (Figure 2.2 e 2.3) si può notare come il valore X_B sia variabile nel tempo; inoltre, come descritto nel capitolo 3.1, il modello PK aggiornato implementa una lenta degradazione della stessa concentrazione, simulando una perdita di efficacia del farmaco. Per tali ragioni il valore di $X_B(t_{treatment_end})$, per quanto sia necessario per la stima dei nuovi parametri del modello esponenziale, risulta, da solo, troppo riduttivo per rispecchiare l'intera cinetica della concentrazione bound (e di conseguenza il suo contributo nella farmacodinamica). Pertanto, il modello aggiornato che descrive la PD di DOXO considera una dipendenza di k_d dal tempo, come indicato nell'equazione (3.4):

$$k_d(t) = C * (1 - e^{-\frac{X_B(t)}{D}}) \quad (3.3)$$

$$\frac{dN}{dt} = (k_p - k_d(t)) * N * (1 - \frac{N}{\theta}) \quad (3.4)$$

Per realizzare ciò in ambiente Matlab è stata sviluppata una nuova *function* "DOXO_PDnew.m" (mostrata in dettaglio nei Codici Matlab) che verrà invocata in sostituzione di "DOXO_PD.m" dal solutore *ode45* all'interno dello script "Simulate_DOXO_PKPD.m" (mostrato in dettaglio nei Codici Matlab).

Con il modello PK/PD implementato, qualunque sia stato il regime dei dosaggi che governa la farmacocinetica, e senza dover supporre un valore costante di popolazione cellulare durante il tempo di somministrazione, basterà conoscere tutte le concentrazioni bound nei tempi del trattamento, il valore della popolazione iniziale N_0 e un valore indicativo di popolazione massima di normalizzazione θ per ottenere una simulazione unica del trattamento che rispecchia la cinetica della concentrazione bound, ovvero la reale dipendenza che lega il farmaco all'andamento di popolazione.

Capitolo 4.

Casi di Studio

Come descritto nel Capitolo 3, le simulazioni PK/PD di DOXO vengono realizzate mediante le function “DOXO_PKnew.m” e “DOXO_PDnew.m” invocate all’interno del programma *main* “Simulate_DOXO_PKPD.m”. Tale programma è quindi capace di generare simulazioni PK/PD in risposta a determinati regimi di dosaggio. A tal fine, all’interno del file *main* è necessario definire una matrice *Plan* che nella prima riga contenga tutti i dosaggi che si vogliono testare, nella seconda gli istanti temporali di somministrazione di ogni dosaggio e, nella terza, i tempi di esposizione di ciascun dosaggio. Un esempio di matrice *Plan* è riportato in Tabella 4.1.

Dosi [nM]	5	10	5	10	5	5
Tempo di Somministrazione [h]	0	120	240	360	480	600
Tempo di Esposizione [h]	6	2	1	3	2	2

Tabella 4.1. Esempio qualsiasi di matrice *Plan* che può essere fornita a “Simulate_DOXO_PKPD.m” per generare la corrispondente simulazione del trattamento che rappresenta.

In aggiunta, nel programma “Simulate_DOXO_PKPD.m” è necessario specificare i restanti attributi sperimentali, quali: la durata della simulazione a seguito dell’ultimo dosaggio (*runningtime*) e il numero iniziale di cellule tumorale N_0 (*nz*).

Operativamente, “Simulate_DOXO_PKPD.m” invoca *ode45* per simulare la farmacocinetica di ogni singolo dosaggio, da quando viene somministrato al tempo di somministrazione successivo, dunque giunto all’ultimo dosaggio, termina l’ultima simulazione dopo il *runningtime* desiderato. Avendo collezionato tutti i valori di X_B lungo tutto il trattamento, genera un’unica simulazione PD invocando nuovamente *ode45* per la farmacodinamica. Infine, vengono generati due grafici, rispettivamente di PK e PD del trattamento complessivo.

In Figura 4.1 vengono mostrati i risultati delle simulazioni relative al regime rappresentato dalla matrice Plan della Tabella 4.1, assumendo una popolazione iniziale di 5000 cellule e un *runningtime* di 48 h.

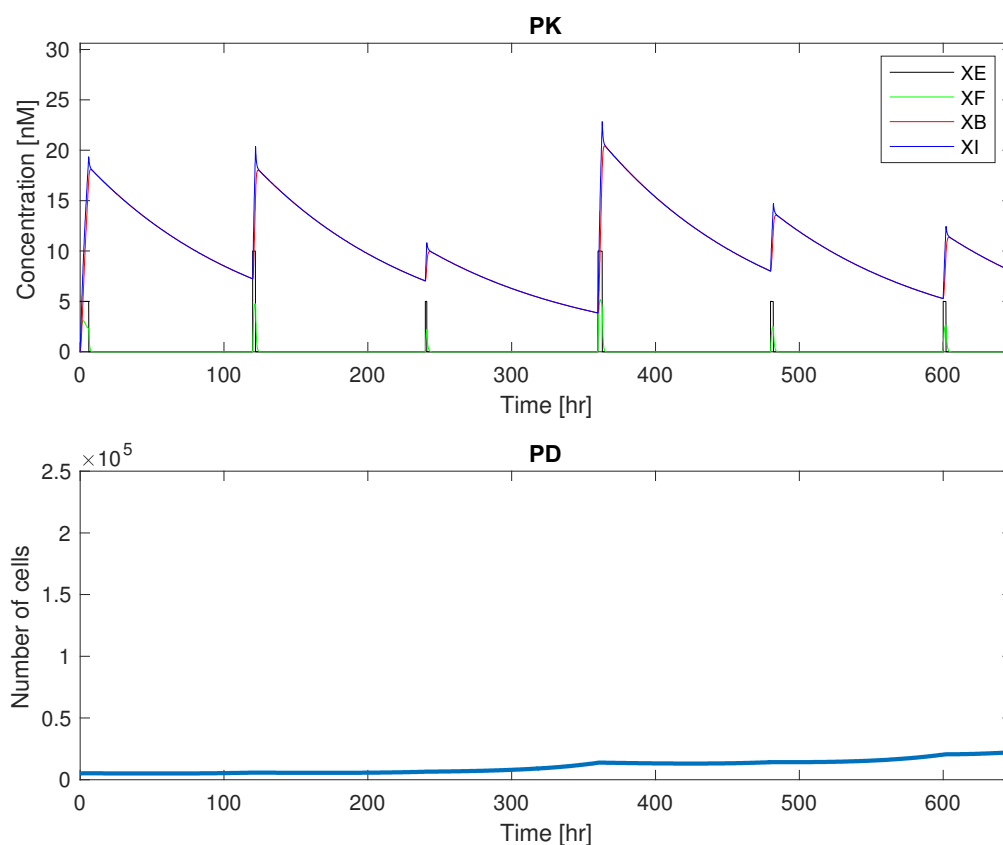


Figura 4.1. Simulazioni PK (in alto) e PD (in basso) generate da “Simulate_DOXO_PKPD.m” per la matrice Plan illustrata in Tabella 4.1 con un N_0 di 5000 cellule e un *runningtime* di 48h.

4.1 Simulazioni di Singoli Dosaggi

Nell'interesse di verificare la validità del nuovo modello rispetto a quelli precedentemente pubblicati [4] [5], vengono mostrate di seguito due simulazioni PK/PD ottenute somministrando una singola dose di DOXO (con tempo di esposizione pari a 3 ore) a 20 nM o 200 nM (Figure 4.2, 4.3), assumendo una popolazione cellulare iniziale di 5000 cellule.

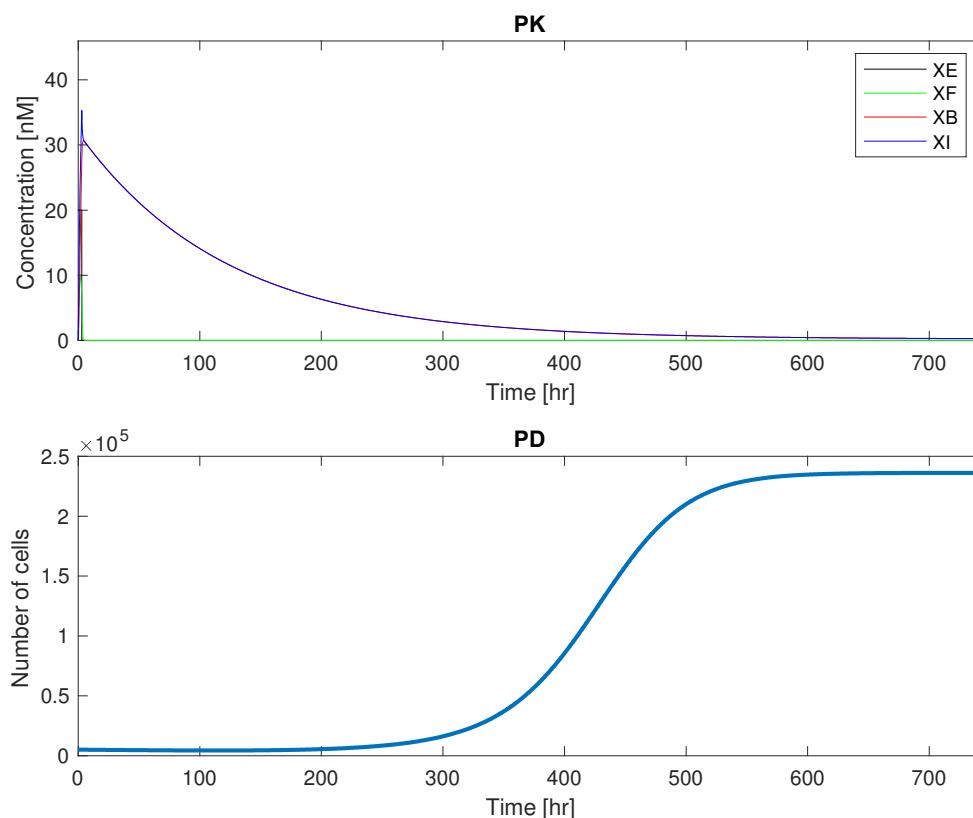


Figura 4.2. Simulazioni PK (in alto) e PD (in basso) generate da "Simulate_DOXO_PKPD.m" per un singolo dosaggio di 20 nM di DOXO e lasciato correre per un mese dalla somministrazione (744 ore), a tre ore di esposizione e con una popolazione iniziale di 5000 cellule. Si può notare una crescita esponenziale della popolazione coincidente con la "coda" della curva di decrescita della concentrazione.

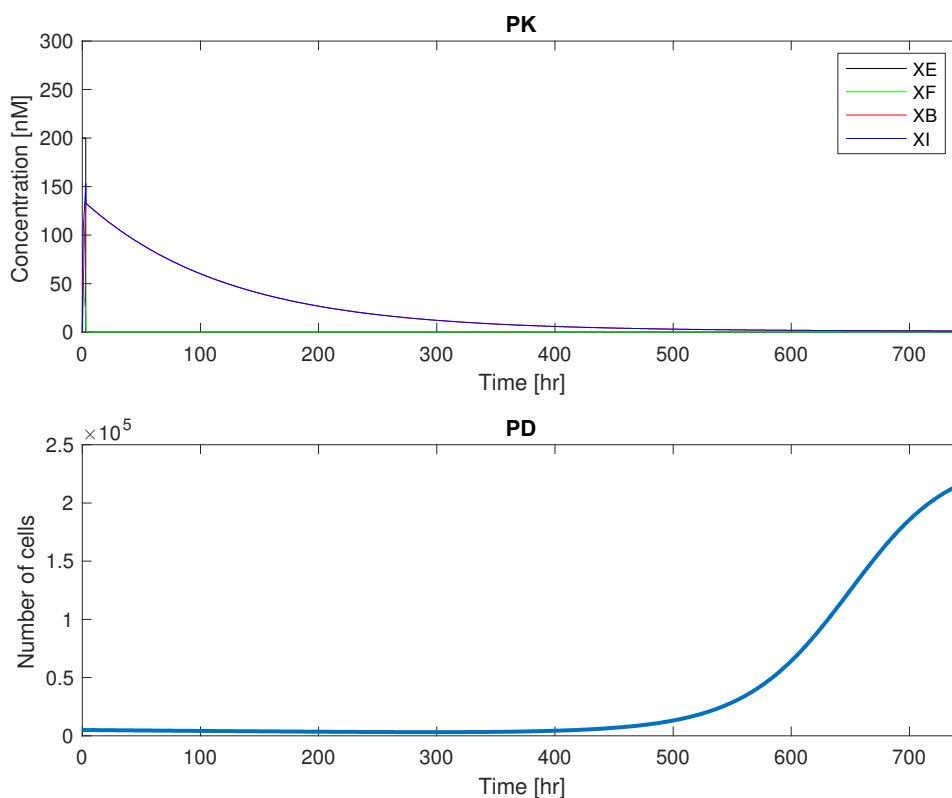


Figura 4.3. Simulazioni PK (in alto) e PD (in basso) generate da "Simulate_DOXO_PKPD.m" per un singolo dosaggio di 200 nM di DOXO e lasciato correre per un mese dalla somministrazione (744 ore), a tre ore di esposizione, e con una popolazione iniziale di 5000 cellule. Si può notare come la crescita esponenziale sia stata traslata nel tempo, ma riesca comunque, dopo un mese, a raggiungere il medesimo valore del numero di cellule della Figura 4.2.

Per entrambe le simulazioni, la proliferazione e morte cellulare viene monitorata su un arco temporale di un mese (744 ore) dal tempo di somministrazione.

Confrontando le Figure 4.2 e 4.3, è possibile apprezzare l'effetto del diverso dosaggio sulla proliferazione cellulare, in particolare si nota come un dosaggio elevato favorisca una soppressione della proliferazione cellulare più prolungata (circa 450 ore) rispetto ad un dosaggio inferiore (circa 250 ore). Tuttavia, è possibile osservare come, per entrambi i dosaggi, la ripresa della proliferazione sia inevitabile fornendo un singolo dosaggio di DOXO, nell'arco di un mese, una singola somministrazione di DOXO a 20 nM o 200 nM porta allo stesso elevato numero di cellule tumorali vive.

Questa riflessione può portare, nell'ottica di voler ottenere un assestamento o addirittura una riduzione della popolazione tumorale nell'arco di un mese, a valutare il possibile effetto di dosaggi ripetuti nello stesso arco di tempo.

4.2 Simulazioni di dosaggi ripetuti

In questa sezione viene valutato il potenziale effetto sulla proliferazione cellulare a seguito di dosaggi ripetuti di DOXO nell'arco di un mese, variando di volta in volta la frequenza di somministrazione, il tempo di esposizione o l'ammontare di ogni dosaggio.

4.2.1 Effetto della frequenza di somministrazione

In Figura 4.3 viene mostrato il risultato ottenuto simulando una somministrazione di DOXO a 2 nM con tempo di esposizione 3 ore e frequenza di ripetizione ogni 3 giorni.

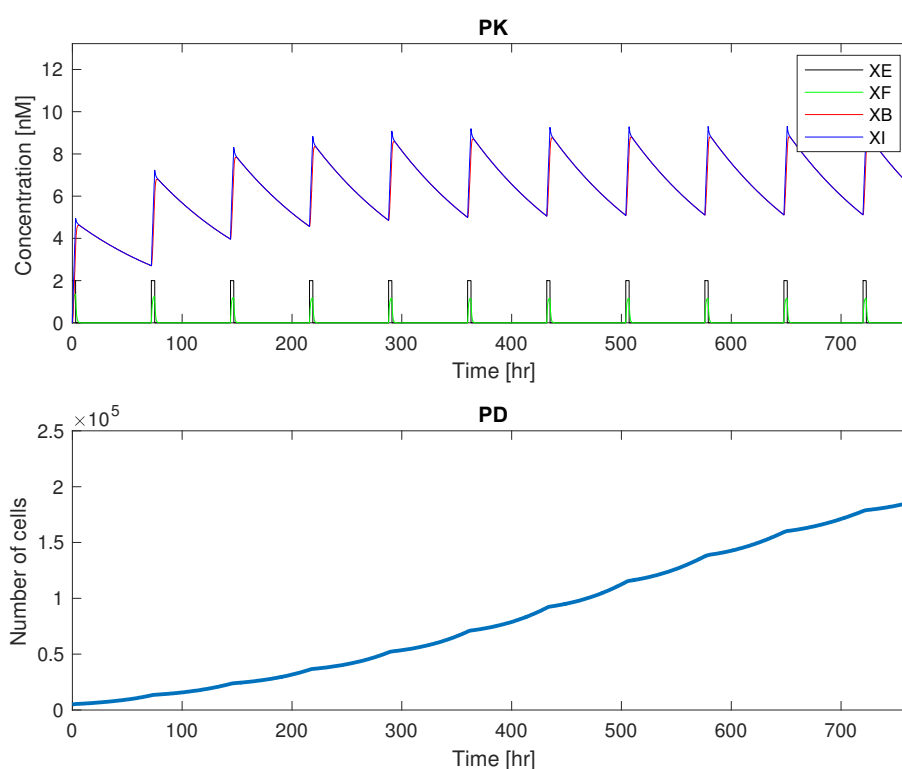


Figura 4.4. Simulazioni PK (in alto) e PD (in basso) generate da "Simulate_DOXO_PKPD.m" per una Plan di dosaggi tutti uguali a 2 nM e tempo di esposizione di 3h ogni tre giorni per la durata di un mese (744 ore), e con una popolazione iniziale di 5000 cellule.

Come si può osservare, la concentrazione intracellulare (e bound) raggiunge un range a regime compreso tra 5 nM e 9 nM. In termini di effetti farmacodinamici, un simile trattamento non risulta efficace nel controllare la proliferazione cellulare, la quale non subisce una soppressione

rilevante, raggiungendo un valore di fine esperimento prossimo a quelli visti in Figure 4.2 e 4.3.

Incrementando la frequenza di somministrazione da 3 a 2 giorni (Figura 4.5), si osserva come lo stesso dosaggio si traduca in una concentrazione intracellulare a regime compresa tra 8 nM e 12 nM, e un effetto più evidente sulla PD decisamente più apprezzabile, con un incremento di proliferazione più lento e un numero di cellule a fine trattamento più basso di circa il 75% rispetto alla frequenza di somministrazione precedente.

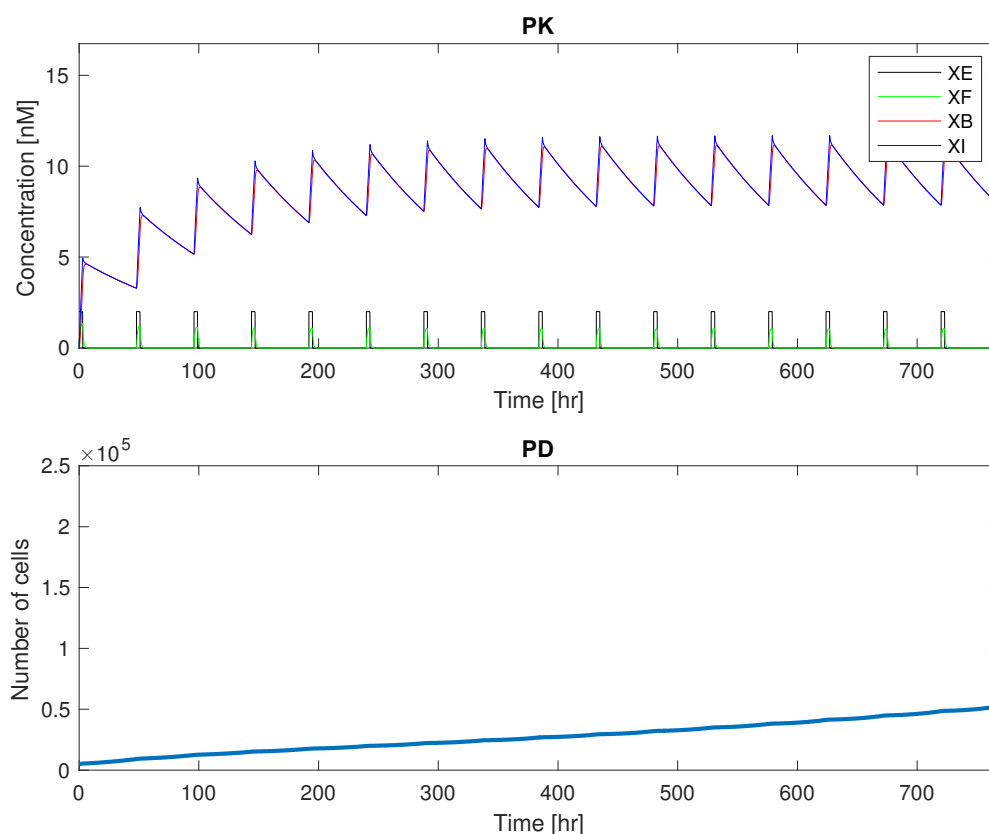


Figura 4.5. Simulazioni PK (n alto) e PD (in basso) generate da "Simulate_DOXO_PKPD.m" per una Plan di dosaggi tutti uguali a 2 nM e tempo di esposizione di 3h ogni due giorni per la durata di un mese (744 giorni), e con una popolazione iniziale di 5000 cellule. Si può notare un netto miglioramento nell'effetto farmacodinamico.

Incrementando nuovamente la frequenza di somministrazione a ogni giorno, l'effetto del trattamento migliora ulteriormente (Figura 4.6): la concentrazione intracellulare a regime si assesta tra i 14 nM e i 18 nM, e il numero totale di cellule vive resta pressoché invariato.

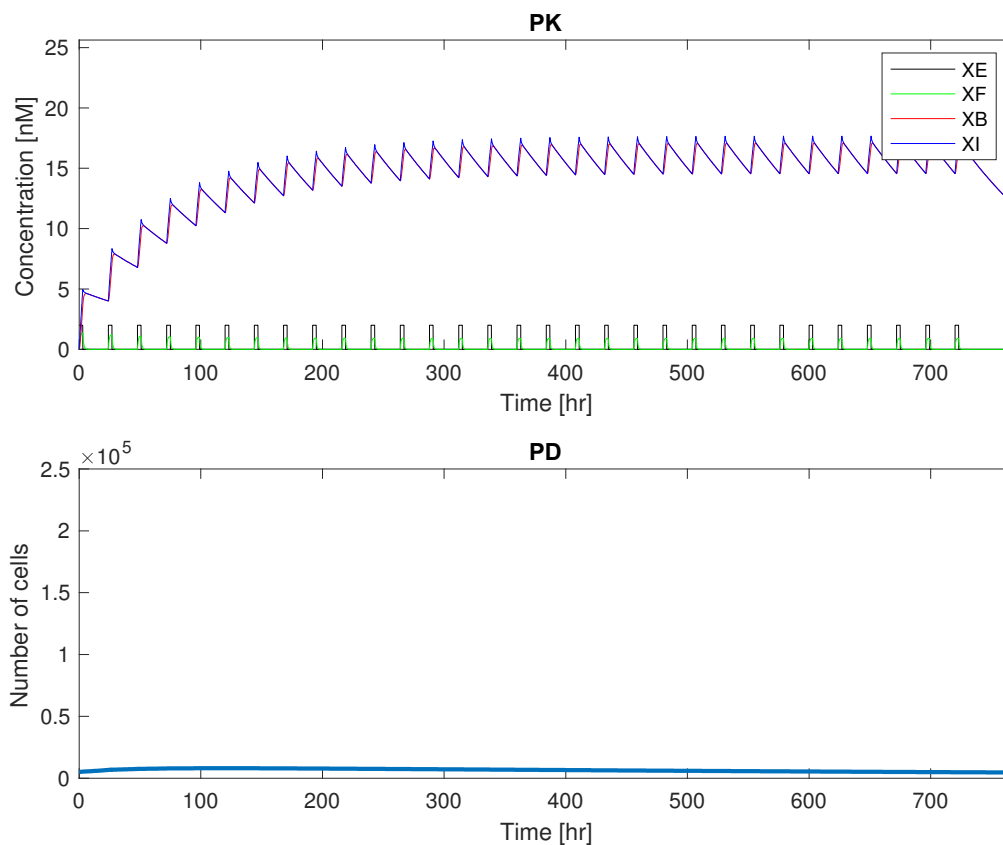


Figura 4.6. Simulazioni PK (n alto) e PD (in basso) generate da "Simulate_DOXO_PKPD.m" per una Plan di dosaggi tutti uguali a 2 nM e tempo di esposizione di 3h ogni giorno per la durata di un mese (744 ore), e con una popolazione iniziale di 5000 cellule. Si può notare finalmente una decrescita della popolazione tumorale.

4.2.2 Effetto del diverso dosaggio

Nell'intento di ottenere risultati simili a quelli riportati in Figura 4.6, ma impiegando la frequenza di trattamento iniziale, è stata condotta una simulazione aumentando il dosaggio di DOXO a 5 nM per 3 ore ogni 3 giorni. I risultati, riportati in Figura 4.7, mostrano come l'effetto farmacodinamico sia del tutto confrontabile a quello di Figura 4.6.

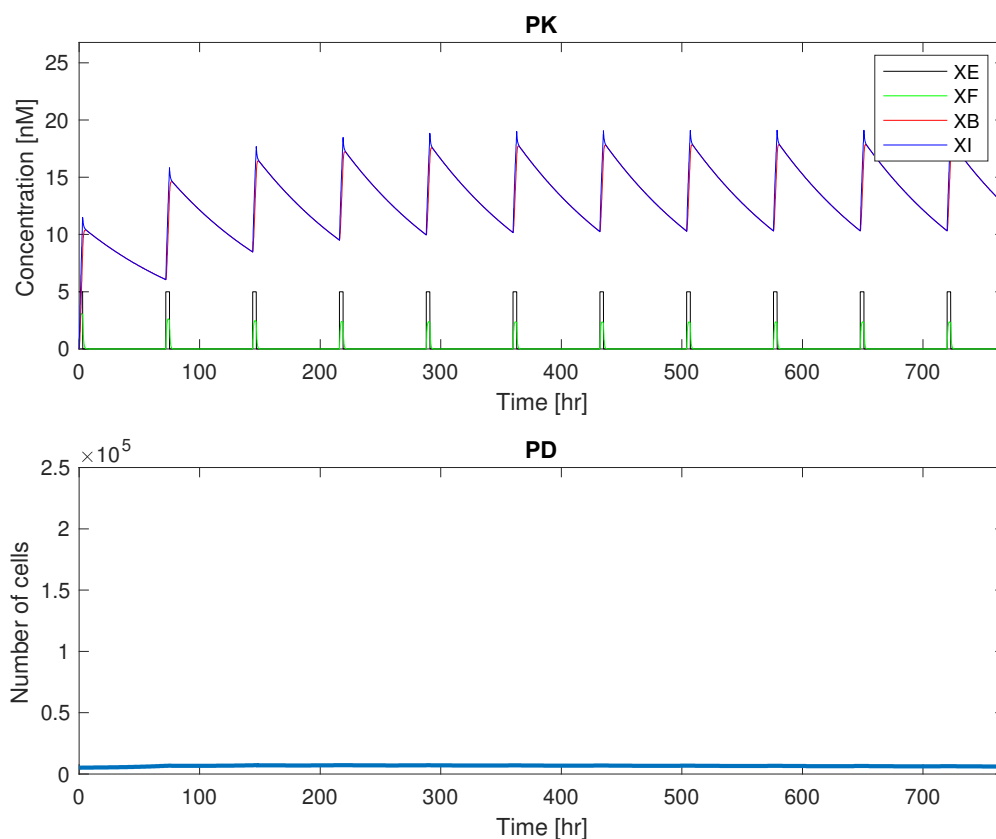


Figura 4.7. Simulazioni PK (n alto) e PD (in basso) generate da "Simulate_DOXO_PKPD.m" per una Plan di dosaggi tutti uguali a 5 nM e tempo di esposizione di 3h ogni tre giorni per la durata di un mese (744 ore), e con una popolazione iniziale di 5000 cellule.

Sebbene i due diversi trattamenti generino lo stesso effetto farmacodinamico, vale la pena soffermarsi sull'analisi farmacocinetica: la concentrazione intracellulare in Figura 4.6 oscilla più frequentemente e con ampiezze più contenute, in accordo con il regime di dosaggio simulato. Viceversa, la concentrazione di DOXO intracellulare in Figura 4.7 raggiunge valori più elevati con variazioni a regime comprese tra 10 nM e 19 nM, circa il doppio dell'ampiezza ottenuta impiegando un dosaggio di 2 nM. Dunque, si può concludere che, aumentare la frequenza ha lo stesso effetto farmacodinamico che aumentare il dosaggio. In poche parole, terapie con elevati dosaggi e meno ripetizioni inducono gli stessi effetti farmacodinamici di dosaggi inferiori (e quindi potenzialmente meno tossici) ma più frequenti.

4.2.3 Effetto del tempo di esposizione

Allungare il tempo di esposizione al trattamento implica, a parità di dosaggio, un maggior tempo di permanenza del farmaco e di conseguenza un aumento di concentrazione intracellulare dello stesso. Al fine di minimizzare gli effetti di tossicità del trattamento, occorre quindi, nel caso di esposizioni al farmaco più prolungate, ridurre la dose somministrata.

Ipotizzando un possibile impiego di un dispositivo in grado di somministrare correttamente piccole dosi di DOXO durante un tempo desiderato, è stata condotta una simulazione con dosaggi di DOXO a 0.2 nM somministrati per 48 ore e ripetuti ogni 3 giorni.

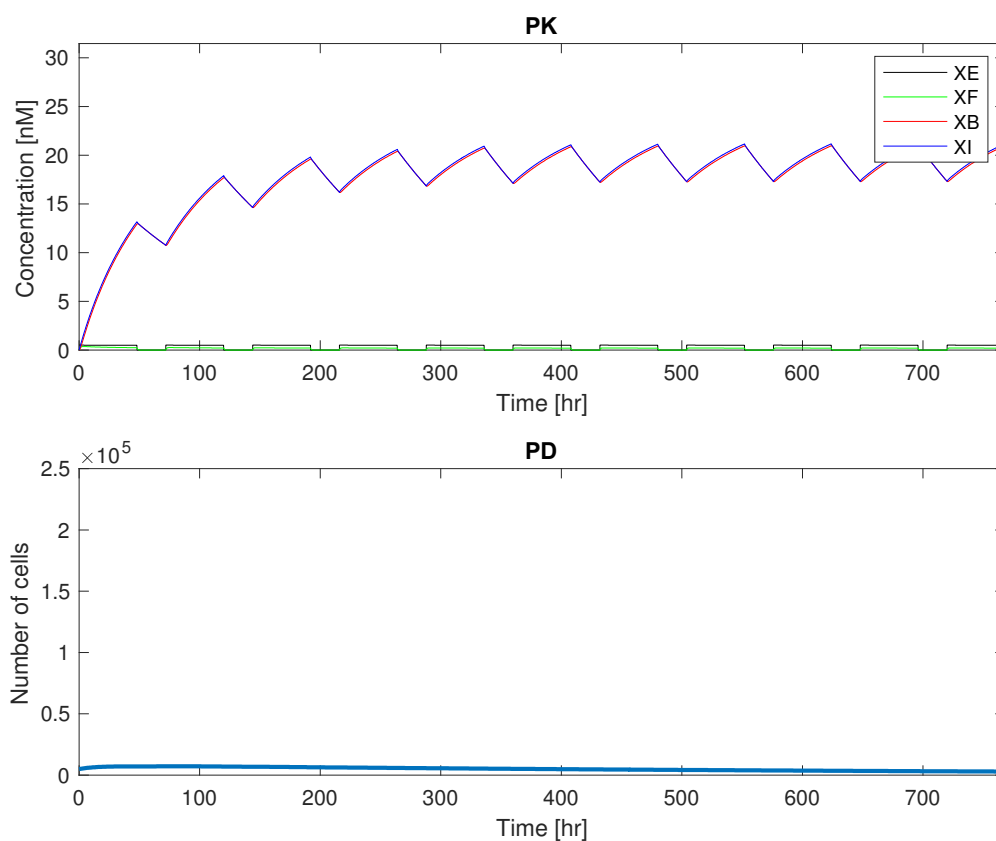


Figura 4.7. Simulazioni PK (n alto) e PD (in basso) generate da "Simulate_DOXO_PKPD.m" per una Plan di dosaggi tutti uguali a 0.5 nM e tempo di esposizione di 48h ogni tre giorni per la durata di un mese (744 ore), e con una popolazione iniziale di 5000 cellule.

I risultati forniti in Figura 4.8 mostrano come un tale regime di trattamento sia in grado di provocare un effetto farmacodinamico analogo a quello osservato in Figure 4.6 e 4.7. Dal punto di vista farmacocinetico la concentrazione intracellulare a regime risulta limitata tra 17 nM e 21 nM ed ha oscillazioni molto meno ampie. Possiamo notare come l'esposizione sia un

parametro cruciale a cui, ad un valore maggiore, corrisponde maggiore costanza del valore della concentrazione nel tempo. Inoltre, alla sua crescita segue un maggior effetto add-up nella concentrazione che quindi può raggiungere picchi più alti della Figura 4.7, somministrando dosaggi dieci volte inferiori.

Conclusioni

I modelli matematici PD e PK forniscono uno strumento prezioso per ottimizzare l'efficacia dei farmaci antitumorali, come nel caso del trattamento del tumore al seno, personalizzando le terapie in base alle caratteristiche individuali dei pazienti e massimizzando al contempo l'efficacia e la sicurezza. Nel caso del mieloma multiplo, la ricerca, ancora alle prime fasi, è stata in grado di identificare due modelli indipendenti PK e PD della Doxorubicina (DOXO), sviluppati precedentemente a partire da esperimenti *in vitro*, e ripresentati in dettaglio in questo documento.

L'attività di questa tesi ha avuto come scopo l'integrazione di questi due modelli esistenti in un'unica struttura PK/PD, mettendo in comunicazione la concentrazione di DOXO *attiva* (legata al DNA delle cellule tumorali) e il tasso di morte cellulare del modello PD (k_d), in precedenza dipendente unicamente dall'ammontare di farmaco somministrato.

Il modello PK/PD sviluppato è in grado di simulare gli effetti farmacocinetici e farmacodinamici per un qualsiasi intero trattamento antitumorale, e quindi in risposta ad un determinato dosaggio, ma anche al tempo di esposizione e a una sua eventuale ciclicità di somministrazione. Ciò permette di apprezzare e valutare diversi regimi terapeutici e stabilire quale permetta di fornire l'effetto ottimo desiderato.

Trattandosi di un'attività prototipale, il modello PK/PD proposto soffre di alcune limitazioni. In primo luogo, il modello è stato sviluppato a partire da uno specifico farmaco (DOXO) ed una specifica linea cellulare (MMR1). Questo preclude la possibilità di impiego su ulteriori linee cellulari e considerando farmaci alternativi. Pertanto, è auspicabile che possibili sviluppi futuri verranno condotti in tali direzioni, al fine di ampliare l'applicabilità e l'utilità del modello stesso. Tuttavia, è importante sottolineare come i risultati ottenuti siano di grande rilevanza, in quanto dimostrano le potenzialità del modello sviluppato nel permettere il test di diversi regimi di dosaggio. Ipotizzando una sua estensione e applicazione in un contesto fisiologico, questo strumento potrebbe fornire informazioni utili relative ad un determinato trattamento, che potrebbe risultare efficace per un paziente con determinate caratteristiche, ma inefficace o addirittura tossico/pericoloso per un altro. Non è quindi da escludere che, in futuro, tale modello PK/PD ha il potenziale di fungere da supporto decisionale in un contesto di personalizzazione della terapia antitumorale.

Codici Matlab

DOXO_PK.m: funzione che implementa le equazioni del modello PK di DOXO (2.1).

```
function dy = Doxo_PK(T,y,FLAG,struct)

dy = NaN(size(y));

% efflux rate described by Hill function
struct.kEF =struct.VmaxEF*(y(3)^(struct.qEF-
1))/(struct.kthEF^struct.qEF+(y(3))^struct.qEF); % 3-B 2-F

% Model
% dX_E/dt
dy(1)= struct.kEF*struct.Vic/struct.Vec*y(2) -struct.kFE*y(1);

% dX_F/dt
dy(2)= struct.kFE*struct.Vec*y(1)/struct.Vic -struct.kEF*y(2) -
struct.kBF*y(2);

% dX_B/dt
dy(3)= s
```

Simulate_DOXO_PK.m: script che genera il plot della simulazione PK di DOXO come descritto nel sotto capitolo 2.1.2.

```
clear all
close all
clc

%% Load Experiment Attributes

% load user parameter
Dose = 450; % [nM]
Exposure = 3; % [hr]
th = 236202; % termine di normalizzazione [dimensionless]

% simulation time
Tsim_0 = 0; % [hr]
Tsim_end = 8; % [hr]
struct.t = Tsim_0:1/60:Tsim_end; % [hr]

% treatment
treatment.name = 'DOXO';
treatment.amount = Dose; % [nM]
```

```

treatment.t0 = [0]; % [hr]
treatment.tend = [Exposure]; % [hr]
struct.treatment = treatment;

%% Load Model Parameters PK
% (tabella III)
struct.Vic = 0.0575; % [uL] volume of DOXO in the extracellular space
struct.Vec = 100; % [uL] volume of DOXO in the intracellular space
struct.kFE = 5.06e-4; % [hr^-1] +- 0.39 (CV=7.72%)
struct.VmaxEF = 1.55e5; % [hr^-1] +- 0.20 (CV=12.92%)
struct.kthEF = 1754.50; % [nM]
struct.qEF = 2; % modello IV (q=2) nella ricerca [2] (riferimenti
bibliografici)
struct.kBF = 1.15; % [hr^-1] +- 0.09 (CV=7.71%)

%% System Initial Conditions PK
x0 = [struct.treatment.amount % X_E(0)
0 % X_F(0)
0 % X_B(0)
];

%% PK System Simulation
struct.maxstep = [1/60]; % MatLab documentation

T = [];
Y = [];

struct.options=odeset('AbsTol',1e-8,'MaxStep',struct.maxstep);

for ind_step = 1:2
switch ind_step
case 1
t_span = [struct.treatment.t0 :1/60: struct.treatment.tend]; % [hr]
case 2
x0 = [0; YY(end,2:3)'];
t_span = [struct.treatment.tend :1/60: struct.t(end)]; % [hr]
end
[TT,YY] = ode45('Doxo_PK', t_span, x0, struct.options, struct);
T = [T;TT];
Y = [Y;YY];
end
[T, it, ~] = unique(T);
Y = Y(it,:);
y = interp1(T, Y, struct.t);
%% Plot
% plot delle varie concentrazioni (XE, XI e relative componenti XF
XB) in
% funzione del tempo
name = string(struct.treatment.amount)+' nM';
figure;
title(string(struct.treatment.amount)+' nM');
plot(struct.t,y(:,2),'g',struct.t,y(:,3),'r');
hold on
plot(struct.t,y(:,2)+y(:,3),'color',[0.8500 0.3250 0.0980]);
title('PK');
xlabel('Time [hr]');
ylabel('Concentration [nM]');
legend('XF','XB','XI');

```

```
axis([0 8 0 330]);
```

DOXO_PD.m: funzione che implementa l'equazione del modello PD di DOXO (2.4).

```
function dN = Doxo_PD(T,N,FLAG,struct)

dN = NaN(size(N));

% Death rate parameter
struct.kd = struct.A*(1-exp((-struct.treatment.amount)/struct.B));

% Model
% dN/dt
dN = (struct.kp-struct.kd)*N*(1-(N/struct.theta));
```

DEATHRATE.m: funzione che implementa l'equazione del parametro di morte (2.5).

```
function y = DEATHRATE(par,Xb,kd)
A = par(1);
B = par(2);
y = kd - A*(1-exp((-Xb/B)));
```

Simulate_DOXO_PD.m: script che genera il plot della simulazione PK di DOXO come descritto nel sotto capitolo 2.1.2.

```
clear all
close all
clc

%% Load Experiment Attributes

% load user parameter
Dose = 200; % [nM]
Exposure = 3; % [hr]
nz = 8039; % numero iniziale di cellule [dimensionless]
th = 236202; % termine di normalizzazione [dimensionless]

%% Load Model Parameters & System Initial Conditions PD
% (tabella I)
struct.kp = 0.0342; % [hr^-1] proliferation rate (CV=11.69%)
struct.N0 = nz; % [-] initial cell amount (CV=39.88%)
struct.theta = th; % [-] maximum number of cells (CV=4.65%)
struct.A = 0.05; % [hr^-1] maximum value of the death rate (CV=3.02%)
struct.B = 41.65; % [nM] shape of the curve

% simulation time
Tsim_0 = 0; % [hr]
Tsim_end = 400; % [hr]
struct.t = Tsim_0:1/60:Tsim_end; % [hr]
% treatment
treatment.name = 'DOXO';
```

```

treatment.amount = Dose; % [nM]
treatment.t0 = [0]; % [hr]
treatment.tend = [Exposure]; % [hr]
struct.treatment = treatment;

%% PD System Simulation
struct.maxstep = [1/60]; % MatLab documentation

T = [];
N = [];

struct.options=odeset('AbsTol',1e-8,'MaxStep',struct.maxstep);
[TT,NN] = ode45('Doxo_PD', struct.t, struct.N0, struct.options,
struct);
T = [T;TT];
N = [N;NN];
[T, it, ~] = unique(T);
N = N(it,:);

n = interp1(T, N, struct.t);

%% Plot
% plot delle varie concentrazioni (XE, XI e relative componenti XF
XB) in
% funzione del tempo
z = struct.treatment.t0 :1/60: struct.treatment.tend;
t = cat(2,z,struct.t + struct.treatment.tend);
pre_n = struct.N0*ones(1,length(z));
n = cat(2,pre_n,n);
figure
plot(t,n,"LineWidth",2);
title('PD');
xlabel('Time [hr]');
ylabel('Number of cells');
axis([0 400 0 400000]);

```

DOXO_PKnew.m: funzione che implementa le nuove equazioni del modello PK di DOXO aggiornato (3.1).

```

function dy = NewDoxo_PK(T,y,FLAG,struct)

dy = NaN(size(y));

% efflux rate described by Hill function
struct.kEF =struct.VmaxEF*(y(3)^(struct.qEF-
1))/(struct.kthEF^struct.qEF+(y(3))^struct.qEF);

% Model
% dX_E/dt
dy(1)= struct.kEF*struct.Vic/struct.Vec*y(2) -struct.kFE*y(1);

% dX_F/dt
dy(2)= struct.kFE*struct.Vec*y(1)/struct.Vic -struct.kEF*y(2) -
struct.kBF*y(2);

```

```
% dXB/dt
dy(3) = struct.kBF*y(2)-0.0082*y(3);
```

DEATHRATE_NEW_ESTIMATES.m: script che realizza la stima dei nuovi parametri C e D dell'equazione (3.2) e riportata in Tabella 3.1.

```
clearvars
close all
clc
load kd_data.mat
%% Load Dataset
D = [15, 20, 40, 50, 200, 450, 900]; % [nM]
exposuretime = 3; % [hr]
%% Load parametri del simulatore
Tsim_0 = 0; % [hr]
Tsim_end = 8; % [hr]
struct.t = Tsim_0:1/60:Tsim_end; % [hr]
treatment.name = 'DOXO';
treatment.t0 = [0]; % [hr]
treatment.tend = [exposuretime]; % [hr]
struct.treatment = treatment;
struct.Vic = 0.0575; % [uL] volume of DOXO in the extracellular space
struct.Vec = 100; % [uL] volume of DOXO in the intracellular space
struct.kFE = 5.06e-4; % [hr-1] +- 0.39 (CV=7.72%)
struct.VmaxEF = 1.55e5; % [hr-1] +- 0.20 (CV=12.92%)
struct.kthEF = 1754.50; % [nM]
struct.qEF = 2; % modello IV (q=2) nella ricerca [2] (riferimenti bibliografici)
struct.kBF = 1.15; % [hr-1] +- 0.09 (CV=7.71%)

% Inizializzazione del simulatore
Xb = zeros(7,1);
j=1;

%% SIMULATORE
for i = 1:length(D)
    Dose = D(i);
    struct.treatment.amount = Dose; % [nM]
    x0 = [struct.treatment.amount % XE(0)
          0 % XF(0)
          0 % XB(0)
          ];

    %% PK System Simulation
    struct.maxstep = [1/60]; % MatLab documentation

    T = [];
    Y = [];

    struct.options=odeset('AbsTol',1e-8,'MaxStep',struct.maxstep);

    for ind_step = 1:2
        switch ind_step
            case 1
```

```

            t_span = [struct.treatment.t0 :1/60:
struct.treatment.tend]; % [hr]
            case 2
                x0 = [0; YY(end,2:3)'];
                t_span = [struct.treatment.tend :1/60:
struct.t(end)]; % [hr]
            end
            [TT,YY] = ode45('Doxo_PK', t_span, x0, struct.options,
struct);
            T = [T;TT];
            Y = [Y;YY];
        end
        [T, it, ~] = unique(T);
        Y = Y(it,:);
        y = interp1(T, Y, struct.t);
        Xb_t(:) = y(:,3);
        Xb(j) = Xb_t(exposuretime*60);
        j= j+1;
    end

%% STIMA
A = 0.05; % [hr^-1] maximum value of the death rate (CV=3.02%)
B = 41.65; % [nM] shape of the curve
p = [A,B]; % initial parameters
pup = p*10;
pdown = p/10;
options = optimset('TolFun',1e-7,'TolX',1e-7);
[p_est,RESNORM,RESIDUAL,EXITFLAG,OUTPUT,LAMBDA,J] =
lsqnonlin('DEATHRATE',p,pdown,pup,options,Xb,struct.kd);
% Nuovi parametri
C = p_est(1); % [hr^-1]
D = p_est(2); % [nM]
% Calcolo dei CV
J = full(J);
covpar = inv(J'*J);
sdpar = sqrt(diag(covpar));
cv_par = p_est./sdpar';
CV_C = cv_par(1)*100;
CV_D = cv_par(2)*100;
%% Ora plottiamo la Figura 3.2
subplot(2,1,1)
plot(Dosings,struct.kd,'bd','LineWidth',2);
subplot(2,1,2)
plot(Xb, struct.kd,'rd','LineWidth',2);

```

DOXO_PDnew.m: funzione che implementa le nuove equazioni del modello PD di DOXO aggiornato (3.3) (3.4).

```
function dN = NEWDoxo_PD(T,N,FLAG,struct)

dN = NaN(size(N));

Xb = interp1(struct.t, struct.Xb, T);
% Death rate parameter
struct.kd = struct.A*(1-exp((-Xb)/struct.B));

% Model
% dN/dt
dN = (struct.kp-struct.kd)*N*(1-(N/struct.theta));
```

Simulate_DOXO_PKPD.m: script che genera il plot della simulazione PK/PD di DOXO con i nuovi modelli aggiornati come descritto nel Capitolo 3. Risulta inoltre essere lo script che genera tutte le figure del Capitolo 4.

```
clear all
close all
clc

%% Load Dataset
D = [15, 20, 40, 50, 200, 450, 900]; % [nM]
N0 = [25657, 6355, 23722, 5726, 8039, 3684, 4579]; % CV =
[11.44%, 16.80%, 2.80%, 19.91%, 12.91%, 5.07%, 31.86%]
t = 236202; % CV = 3.99%
theta = [t, t, t, t, t, t, t];

% Costruzione matrice Plan
d = 24; % [hr] equivalente di un giorno
timings = [0, 5, 10, 15, 20, 25]*d; % [hr]
dosings = [5, 10, 5, 10, 5, 5]; % [nM]
exposuretimes = [6, 2, 1, 3, 2, 2]; % [hr]
runningtime = 48; % [hr] 744 5*d
Plan = [dosings; timings; exposuretimes]
nz = 5000; % Numero di cellule iniziale
th = 236202; % ~250000, termine di normalizzazione

% Inizializzazione della matrice delle concentrazioni Xe, Xf ed Xb
y=[0 0 0 ; 0 0 0; 0 0 0];

%% Simulazione di Plan
for i = 1:length(Plan(1,:))
% i-simulation time
Tsim_0 = Plan(2,i); % [hr]
if(i<length(Plan(1,:)))
```



```

Tsim_end = Plan(2,i+1); % [hr]
else
    Tsim_end = Plan(2,i)+runningtime; % [hr]
end
struct.t = Tsim_0:1/60:Tsim_end; % [hr]
% treatment
treatment.name = 'DOXO';
treatment.amount = Plan(1,i); % [nM]
treatment.t0 = [Plan(2,i)]; % [hr]
treatment.tend = Plan(3,i)+Plan(2,i); % [hr]
struct.treatment = treatment;

% Load Model Parameters PK
struct.Vic = 0.0575; % [uL] volume of DOXO in the extracellular space
struct.Vec = 100; % [uL] volume of DOXO in the intracellular space

struct.kFE = 5.06e-4; % [hr^-1] +- 0.39 (CV=7.72%)
struct.VmaxEF = 1.55e5; % [hr^-1] +- 0.20 (CV=12.92%)
struct.kthEF = 1754.50; % [nM]
struct.qEF = 2; % modello IV (q=2)
struct.kBF = 1.15; % [hr^-1] +- 0.09 (CV=7.71%)

%% System Initial Conditions PK
% Continuita tra la simulazione i-esima e quella precedente
x0 = [struct.treatment.amount+y(length(y(:,1)),1) % X_E(0)
      y(length(y(:,2)),2) % X_F(0)
      y(length(y(:,3)),3) % X_B(0)
      ];

%% PK System Simulation
struct.maxstep = 1/60; % MatLab documentation

T = [];
Y = [];

struct.options=odeset('AbsTol',1e-8,'MaxStep',struct.maxstep);

for ind_step = 1:2
    switch ind_step
        case 1
            t_span = struct.treatment.t0 :1/60:
struct.treatment.tend;% [hr]
            case 2
                x0 = [0; YY(end,2:3)'];
                t_span = struct.treatment.tend :1/60: struct.t(end); %
[hr]
            end
            [TT,YY] = ode45('NewDoxo_PK', t_span, x0, struct.options,
struct);
            T = [T;TT];
            Y = [Y;YY];
        end
    [T, it, ~] = unique(T);
    Y = Y(it,:);
    y = y(1:length(y)-1,:);
    if(i==1)
        y = interp1(T, Y, struct.t);
    else
        y = cat(1,y,interp1(T, Y, struct.t));
    end
end

```

```

end

end

%% PK Plot
% plot delle varie concentrazioni (XE, XI e relative componenti XF
XB) in
% funzione del tempo
t = 0:1/60:(length(y(:,1))-1)/60;
subplot(2,1,1);
plot(t,y(:,1),'k',t,y(:,2),'g',t,y(:,3),'r',t,y(:,2)+y(:,3),'b');
title('PK');
xlabel('Time [hr]');
ylabel('Concentration [nM]');
legend('XE','XF','XB','XI');
axis([0 (Plan(2,length(Plan(2,:)))+runningtime) 0
(max(max(y))*1.5)]);

%% PD System Simulation
%% Load Model Parameters & System Initial Conditions PD
struct.kp = 0.0342; % [hr^-1] proliferation rate (CV=11.69%)
struct.theta = th; % [-] maximum number of cells (CV=4.65%)
struct.C = 0.036; % [hr^-1] maximum value of the death rate
(CV=3.02%)
struct.D = 4.184; % [nM] shape of the curve
struct.N0 = nz;
Tsim_0 = Plan(2,1);
Tsim_end = Plan(2,length(Plan(2,:)))+runningtime;
struct.t = Tsim_0:1/60:Tsim_end; % [hr]
struct.maxstep = [1/60]; % MatLab documentation

T = [];
N = [];
struct.Xb = y(:,3);
struct.options=odeset('AbsTol',1e-8,'MaxStep',struct.maxstep);

[TT,NN] = ode45('NEWDoxo_PD', struct.t, struct.N0, struct.options,
struct);
T = [T;TT];
N = [N;NN];
[T, it, ~] = unique(T);
N = N(it,:);

n = interp1(T, N, struct.t);

%% Plot
% plot delle varie concentrazioni (XE, XI e relative componenti XF
XB) in
% funzione del tempo

subplot(2,1,2);
plot(struct.t,n,"LineWidth",2);
hold on
title('PD');
xlabel('Time [hr]');
ylabel('Number of cells');
axis([0 (Plan(2,length(Plan(2,:)))+runningtime) 0 250000]);

```

Riferimenti Bibliografici

[1] Cowan AJ, Green DJ, Kwok M, et al. Diagnosis and Management of Multiple Myeloma: A Review. *JAMA*. 2022;327(5):464–477. doi:10.1001/jama.2022.0003

[2] Huang J, Chan SC, Lok V, Zhang L, Lucero-Prisno DE 3rd, Xu W, Zheng ZJ, Elcarte E, Withers M, Wong MCS; Non-communicable Disease Global Health Research Group, Association of Pacific Rim Universities. The epidemiological landscape of multiple myeloma: a global cancer registry estimate of disease burden, risk factors, and temporal trends. *Lancet Haematol*. 2022 Sep;9(9):e670-e677. doi: 10.1016/S2352-3026(22)00165-X. Epub 2022 Jul 14. PMID: 35843248.

[3] Speth PA, van Hoesel QG, Haanen C. Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. *Clin Pharmacokinet*. 1988 Jul;15(1):15-31. doi: 10.2165/00003088-198815010-00002. PMID: 3042244.

[4] Doshmanziari R, Da Ros F, Mazzucato M, Pedersen MG, Visentin R. Modeling Doxorubicin Pharmacokinetics in Multiple Myeloma Cells. December 2022, Department of Information Engineering, University of Padova, Padova, Italy, SID 2020.

[5] Andreato D, Da Ros F, Mazzucato M, Pedersen MG, and Visentin R. Modelling Doxorubicin Treatment effect in Multiple Myeloma. Department of Information Engineering, University of Padova, Padova, Italy, Aviano National Cancer Institute. GNB2023, June 21st-23rd 2023, Padova, Italy.

[6] Delgado JL, Hsieh CM, Chan NL, Hiasa H. Topoisomerases as anticancer targets. *Biochem J*. 2018 Jan 23;475(2):373-398. doi: 10.1042/BCJ20160583. PMID: 29363591; PMCID: PMC6110615.

[7] Lin JH, Yamazaki M. Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42(1):59-98. doi: 10.2165/00003088-200342010-00003. PMID: 12489979.