

# **Własności ADMET w projektowaniu leków**

**Dr hab. Sabina Podlewska**

**Zakład Chemii Leków, Instytut Farmakologii im.  
Jerzego Maja PAN,  
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków**

**15.04.2024**

# Co sprawia, że związek jest dobrym lekiem?

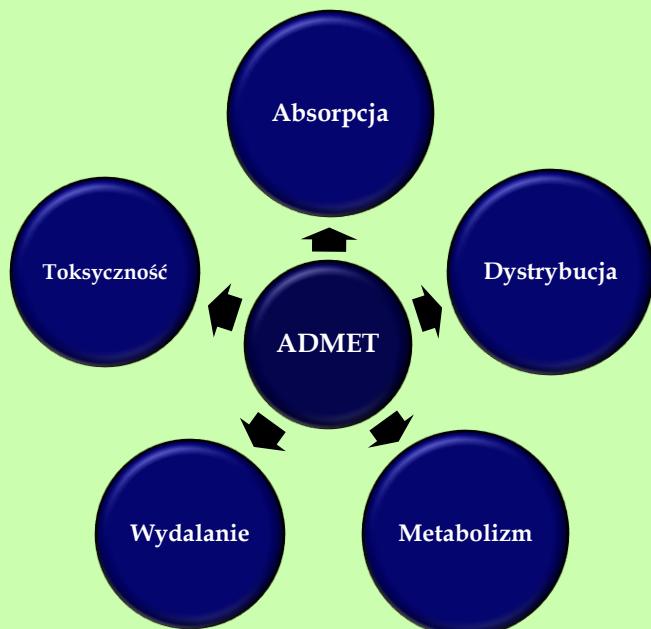
- Odpowiednie powinowactwo do celu biologicznego
- LECZ RÓWNIEŻ:**

- A - absorption
- D - distribution
- M - metabolism
- E - excretion
- T - toxicity

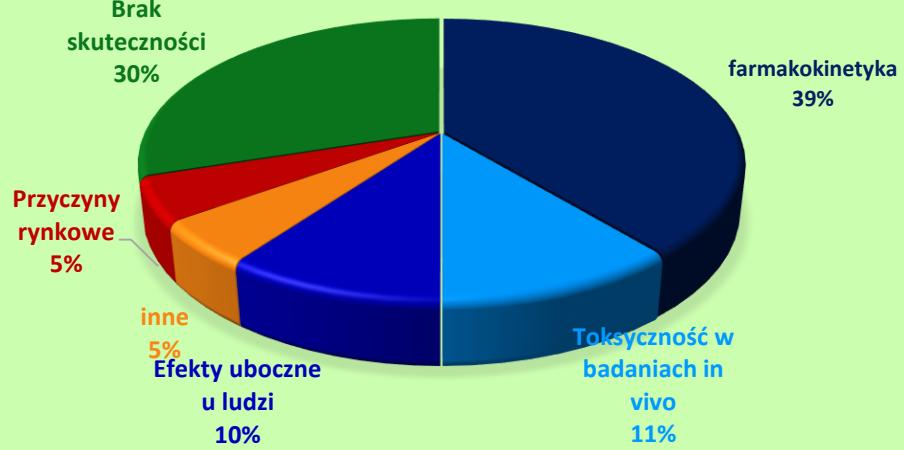
ADMETox – umożliwia zbadanie losów cząsteczki obcej w organizmie – od jej wprowadzenia (absorpcja) do usunięcia (wydalanie), weryfikację czynników wpływających na stężenie danej substancji w organizmie oraz jej aktywność farmakologiczną

# Istotność optymalizacji parametrów ADMET w procesie projektowania leków

## RACJONALNE PROJEKTOWANIE LEKÓW



## PRZYCZYNY NIEPOWODZEŃ RÓŻNYCH KANDYDATÓW NA LEKI



# Losy leku w organizmie



Zażycie  
dawki leku



Osiąganie przez  
lek  
odpowiedniego  
stężenia w  
docelowym  
miejscu  
działania



**Efekt  
farmakologiczny**

**Efekt leczniczy**



**Efekt toksyczny**



**Absorption**

**Distribution**

**Metabolism**

**Excretion**



farmakokinetika



# farmakokinetyka vs. farmakodynamika

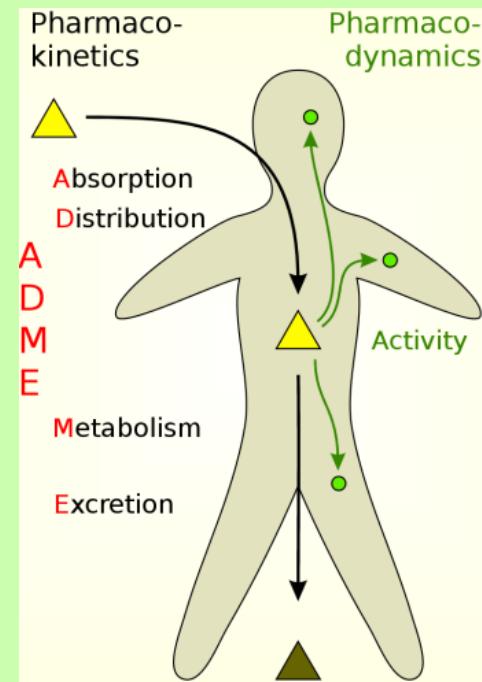
- Farmakokinetyka – bada i opisuje zmiany stężenia leku (i jego metabolitów) w organizmie żywym w czasie.

## Podstawowe parametry farmakokinetyczne:

- objętość dystrybucji
- klirens
- biologiczny okres półtrwania
- średni czas wchłaniania
- średni czas przebywania leku w organizmie
- stężenie maksymalne leku
- czas po podaniu leku jaki upływa do momentu osiągnięcia stężenia maksymalnego

Farmakokinetyka: istotna m.in. dla leków o wąskim indeksie terapeutycznym, które charakteryzują się niewielką różnicą pomiędzy dawką leczniczą a toksyczną.

- Farmakodynamika – opisuje wpływ leku na organizm żywego (charakteryzuje odpowiedź farmakologiczną leku, czas trwania oraz bada zależność: obserwowana odpowiedź organizmu vs. stężenie leku)



<https://www.differencebetween.co/m/difference-between-pharmacokinetics-and-pharmacodynamics/>

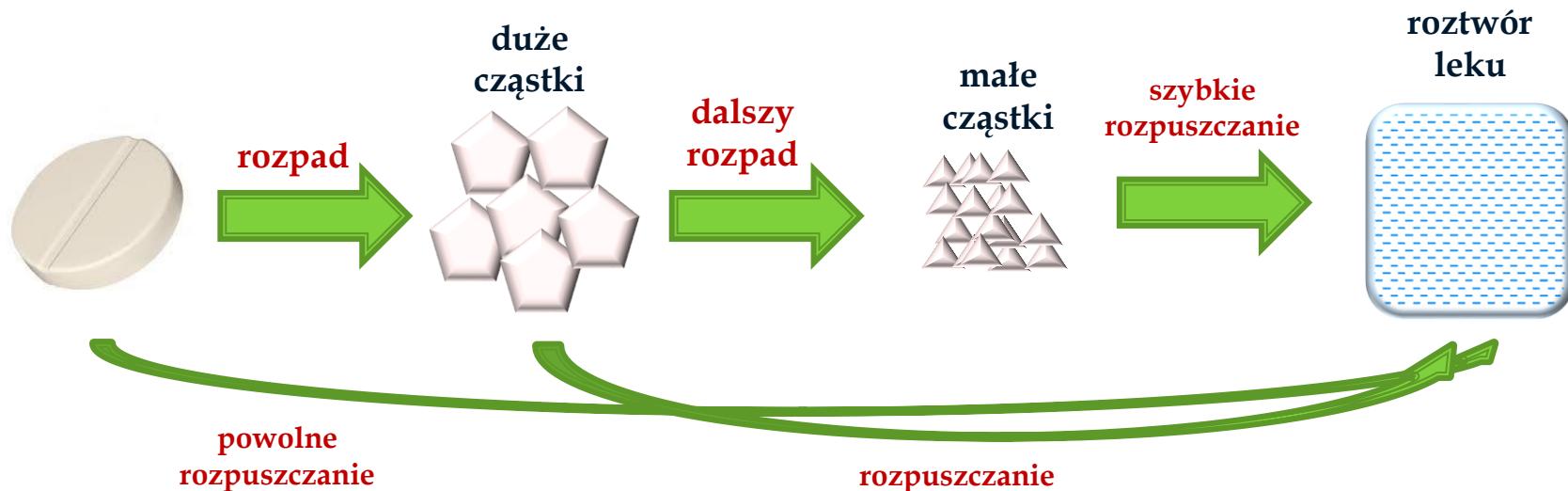
# Biodostępność

Rozpatrując biodostępność danego składnika po jego spożyciu drogą pokarmową (ang. *oral bioavailability*) należy brać pod uwagę:

- uwalnianie składnika z produktu spożywczego w przewodzie pokarmowym (biodostępność),
- rozkład danego składnika w jelitach i transport przez ścianę jelit do organizmu (wchłanianie)
- wprowadzenie niezmetabolizowanej części do centralnego krwiobiegu i jej rozkład w wątrobie (metabolizm).

# Uwalnianie – liberation (LADME)

- Uwalnianie – przechodzenie substancji czynnej z leku do środowiska, z którego może zostać wchłonięta do organizmu (etał pomijany w przypadku podaży dożylnej)



# Czynniki wpływające na proces uwalniania substancji czynnej

- Rodzaj substancji
- Rozpuszczalność substancji
- Szybkość rozpuszczania
- Postać krystalograficzna
- Obecność substancji pomocniczych

**Rozpuszczalność** – zjawisko termodynamiczne (opisuje stan równowagi), cecha fizyczna substancji

**Szybkość rozpuszczania** – pojęcie kinetyczne (substancje, które dobrze się rozpuszczają niekoniecznie rozpuszczają się szybko)

„Corpora non agunt nisi soluta”

# Rozpuszczalność jako warunek działania leku

- Substancje nierozpuszczalne - również wykorzystywane w medycynie, np. w diagnostyce:

**Siarczan baru** - substancja nierozpuszczalna w wodzie, nie wchłania się z przewodu pokarmowego, w postaci zawiesiny stosowany w rentgenodiagnostyce. Najczęściej podaje się niewielką ilość zawiesiny siarczanu baru w celu pokrycia ściany badanego odcinka przewodu pokarmowego, a następnie wypełnia się światło przewodu pokarmowego gazem (powietrze lub dwutlenek węgla) - możliwość uwidocznienia szczegółowej struktury błony śluzowej.

**UWAGA!** Azotan lub chlorek baru są łatwo rozpuszczalne, ulegają wchłanianiu i są silnie trujące.

# Zwiększenie szybkości rozpuszczania

- Modyfikacja chemiczna substancji czynnej
- Rozdrobnienie: **mikronizowanie, sporządzanie niewodnych roztworów**, np. etanolowych (w środowisku wodnym żołądka substancja wytrąca się w postaci drobnych cząstek), **sporządzanie mikrokryystalicznej dyspersji**
- Wzrost efektywnej powierzchni
- Zmiana temperatury
- Mieszanie
- Zmniejszenie lepkości rozpuszczalnika
- Zmiana formy krystalicznej (dobór warunków krystalizacji)
- Zmiana pH (np. dodanie do tabletki substancji zmieniających pH w otoczeniu substancji czynnej)

# Dostępność farmaceutyczna

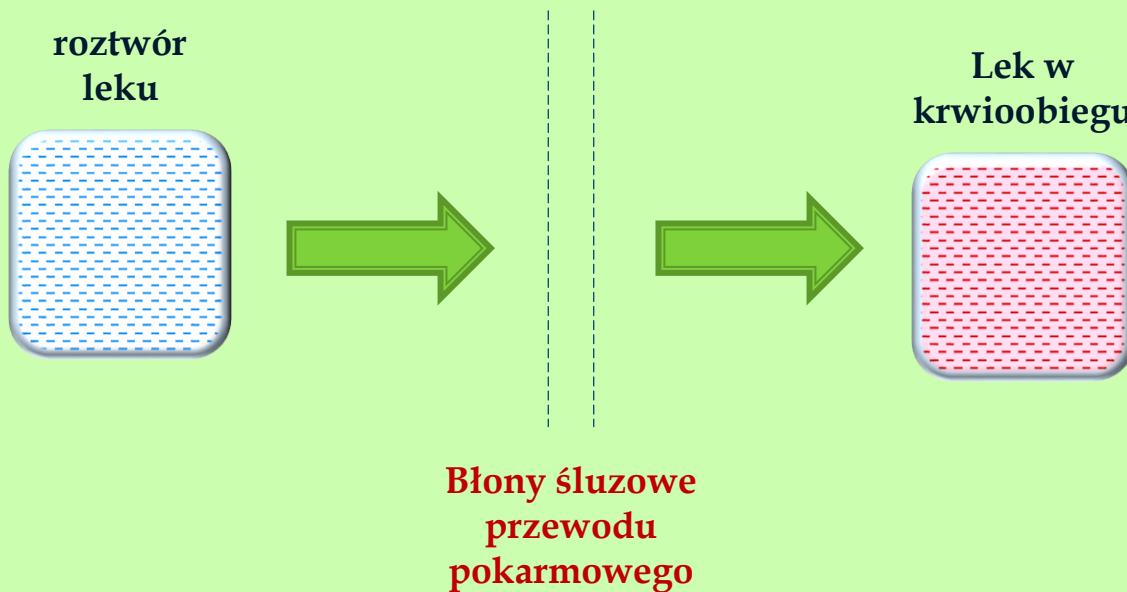
- mierzona w warunkach laboratoryjnych ilość substancji czynnej uwalnianej z preparatu farmaceutycznego i rozpuszczającej się w otaczającym go płynie ustrojowym
- określa szybkość procesu uwalniania
- wyrażana jako procent lub ułamek dawki leku, jaki rozpuścił się w płynie odbiorczym w określonym czasie (np. 80% w ciągu 10 minut)
- podstawowy test analityczny podczas opracowywania postaci leku
- badania dostępności farmaceutycznej - istotny element dokumentacji badanego produktu leczniczego niezbędny do uzyskania pozwolenia do rozpoczęcia prób klinicznych, a także podczas przeprowadzania procedury rejestracyjnej leku

# Badania dostępności farmaceutycznej

- główny cel - określenie powtarzalności procesu technologicznego wytwarzania leków
- wstępne porównanie różnych preparatów farmaceutycznych
- wady: badania prowadzone w warunkach *in vitro* nie odzwierciedlają do końca zachowania leku *in vivo* (w organizmie ludzkim) -> wybrane czynniki wpływające na zmianę uwalniania i wchłaniania substancji leczniczej: zmienne pH soku żołądkowego, interakcje z pożywieniem i innymi lekami, obecność enzymów trawiennych, motoryka przewodu pokarmowego, choroby uposadzające wchłanianie

# Absorpcja (wchłanianie)

- przechodzenie substancji czynnej do krążenia ogólnego

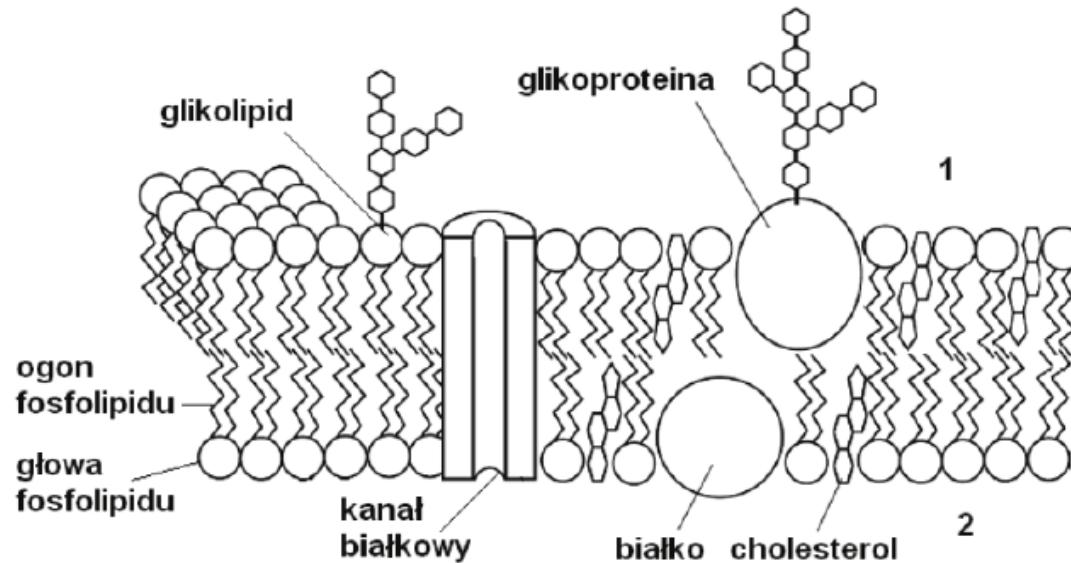


- ocena stopnia wchłaniania jelitowego:
  - niskie (<50%)
  - średnie (50-84%)
  - wysokie ( $\geq 85\%$ )

# Mechanizmy wchłaniania leków w przewodzie pokarmowym

- Dyfuzja bierna
- Transport aktywny
- Transport ułatwiony
- Transport pęcherzykowy (np. pinocytoza)

Bariera konieczna do pokonania podczas wchłaniania – błona komórkowa



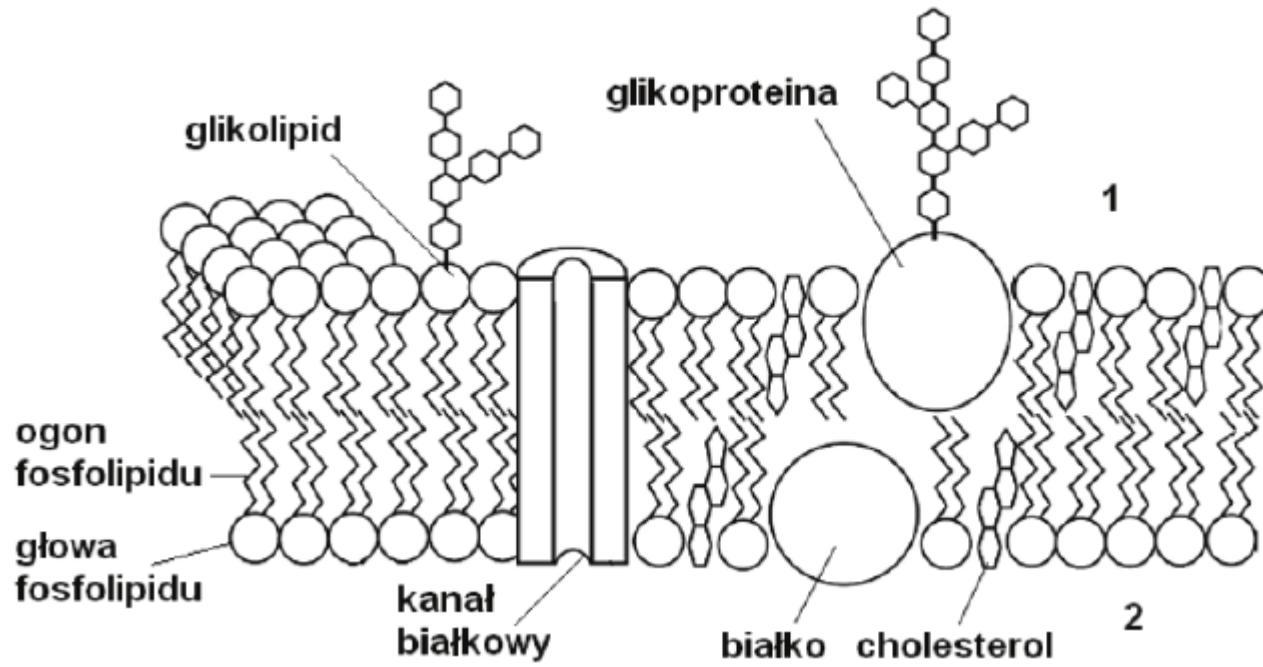
# Błona komórkowa

- Błona cytoplazmatyczna, plazmolemma
- Półprzepuszczalna błona biologiczna oddzielająca wnętrze komórki od świata zewnętrznego
- Pełni funkcję ochronną (chroni komórki zarówno przed czynnikami fizycznymi jak i chemicznymi, a także przed wnikaniem patogenów)
- Reguluje transport substancji do i z komórki
- Wykazuje wrażliwość na bodźce chemiczne, termiczne i mechaniczne
- Katalizuje reakcje metaboliczne (funkcja enzymatyczna)
- Utrzymuje równowagę między ciśnieniem osmotycznym wewnątrz i na zewnątrz komórki
- Umożliwia wzrost, ruch i podział komórki

# Błona komórkowa

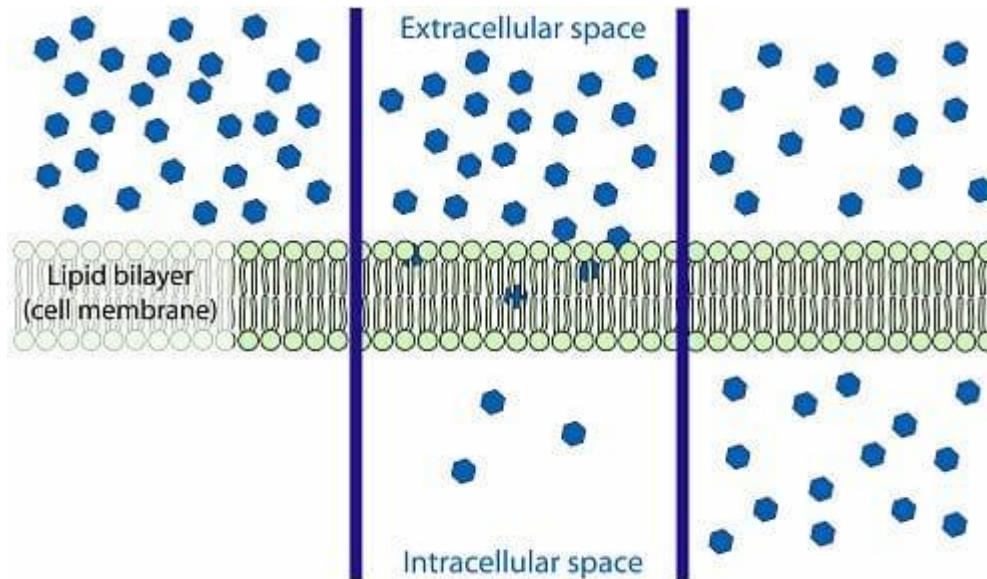
Składniki błony komórkowej:

- Lipidy (30-40% masy błony komórkowej) -> fosfolipidy, sfingolipidy, sterole
- Białka (30-40% masy błony komórkowej)
- Cukry (20-40% masy błony komórkowej) -> zawsze w postaci kowalencyjnego połączenia z lipidami lub białkami (odpowiednio glikolipidy, glikoproteiny)



# Dyfuzja bierna

- Siła napędowa: gradient stężenia po obydwu stronach błony
- Czynnik limitujący: wielkość cząsteczki (w praktyce ograniczona do substancji małocząsteczkowych)
- Ograniczona do substancji niejonowych o średniej polarności (np. woda)
- substancje lipofilne dyfundują łatwiej niż substancje lipofobowe
- substancje niezdysocjowane dyfundują łatwiej niż indywidualnie zjonizowane



# Dyfuzja bierna

- Ilościowo opisywana przez **prawa Ficka**

**Pierwsze prawo Ficka:** szybkość procesu dyfuzji danego składnika wzdłuż kierunku  $x$ , zdefiniowana jako liczba moli  $n$  substancji, która w jednostce czasu przeszła przez powierzchnię  $A$  prostopadłą do  $x$ , jest wprost proporcjonalna do powierzchni  $A$  i do gradientu stężenia w chwili  $t$ :

$$\frac{dn}{dt} = -AD \left( \frac{\partial c}{\partial x} \right)_t$$

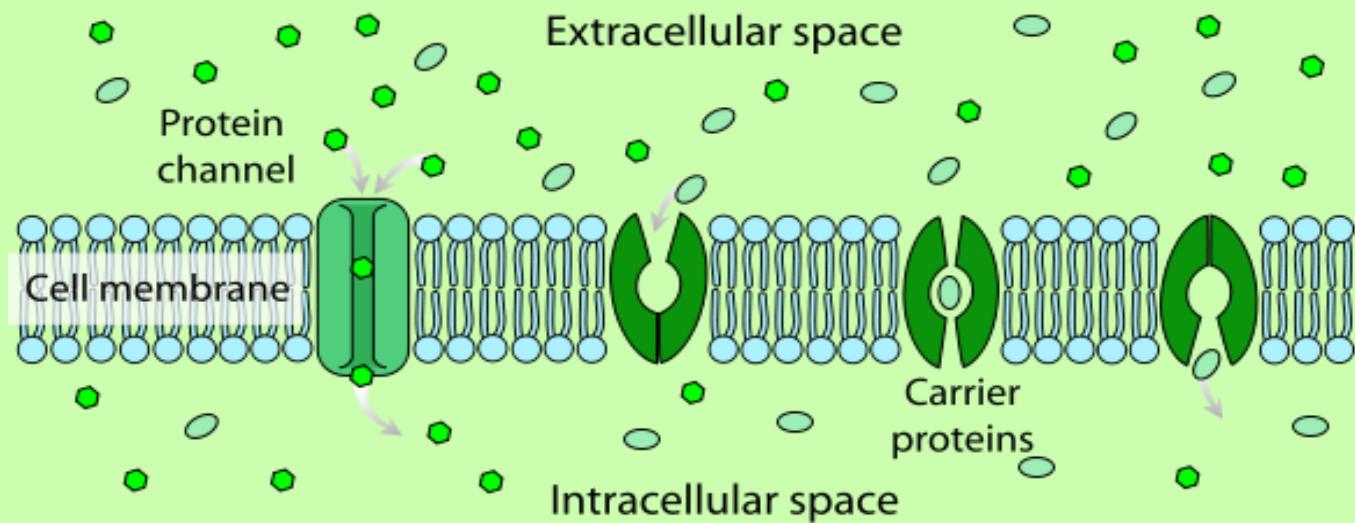
gdzie  $D$  jest współczynnikiem dyfuzji.

**Drugie prawo Ficka** (równanie dyfuzji): określa szybkość zmian stężenia w dowolnym punkcie układu:

$$\left( \frac{\partial c}{\partial t} \right)_x = D \left( \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \right)_t$$

# Transport ułatwiony

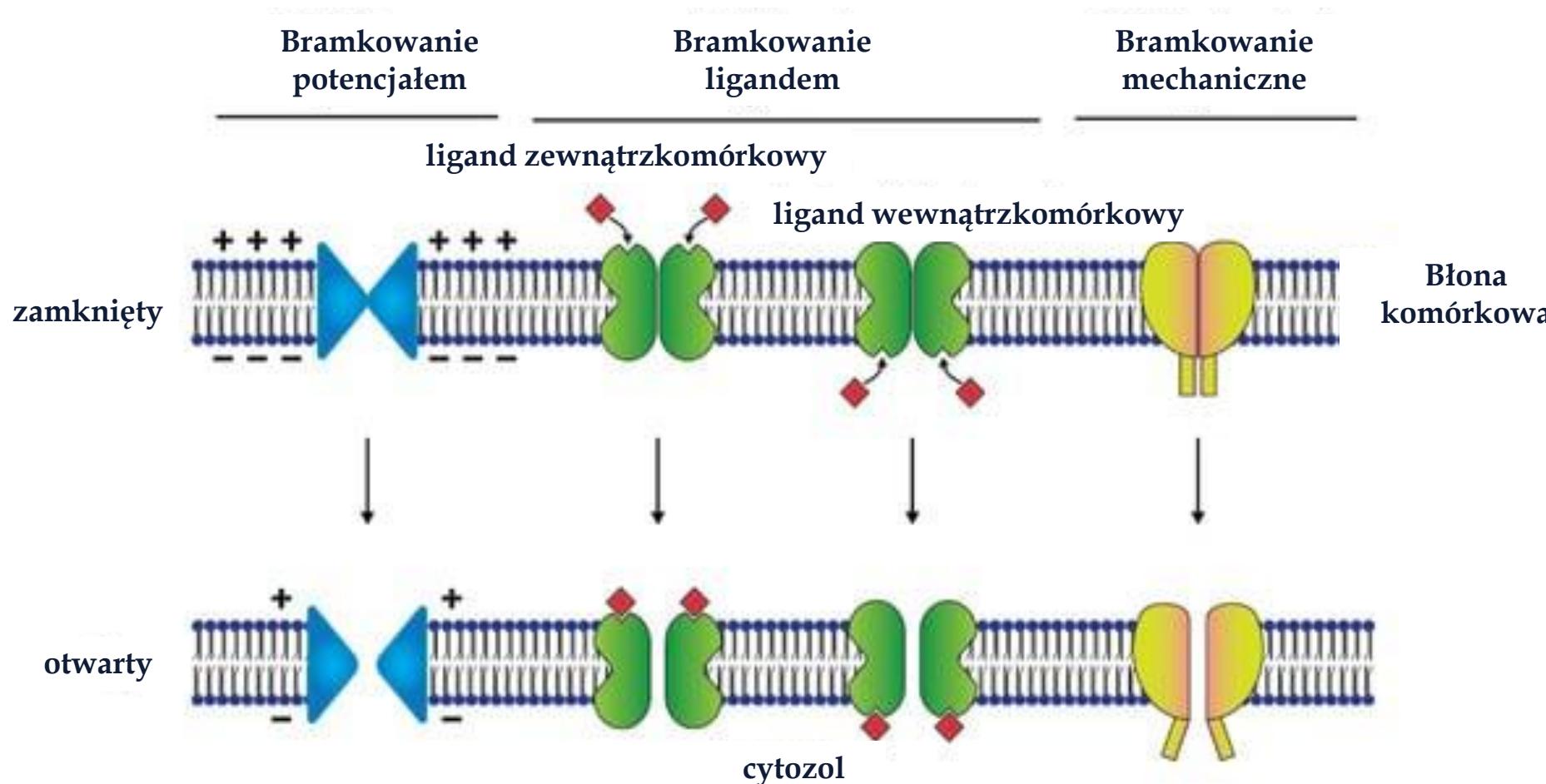
- Podstawowe znaczenie dla prawidłowego działania komórki
- Zachodzi według dwóch mechanizmów:
  - Przenośnikowy
  - Kanałowy



[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Scheme\\_facilitated\\_diffusion\\_in\\_cell\\_membrane-en.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Scheme_facilitated_diffusion_in_cell_membrane-en.svg)

- Wymaga współudziału „nośnika”
- Zachodzi zgodnie z gradientem stężeń
- Cecha charakterystyczna: wysoka selektywność

# Mechanizmy regulacji transportu przez kanały błonowe

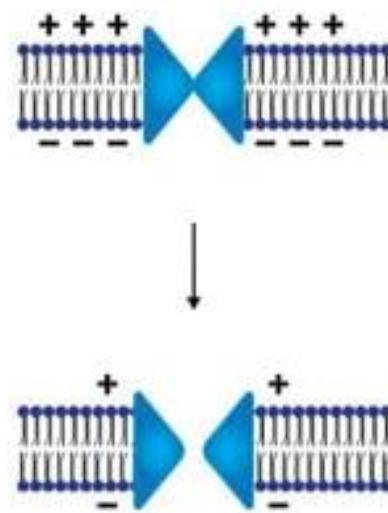


# Regulacja transportu przez białka błonowe

## Bramkowanie potencjałem błonowym

- Zmiana polaryzacji błony wywołuje zmianę konformacji białka błonowego (otwieranie/zamykanie kanału)

**polaryzacja błony** - różnica potencjału elektrycznego po obydwu stronach błony komórkowej (gdy zanika, mamy do czynienia z depolaryzacją błony)



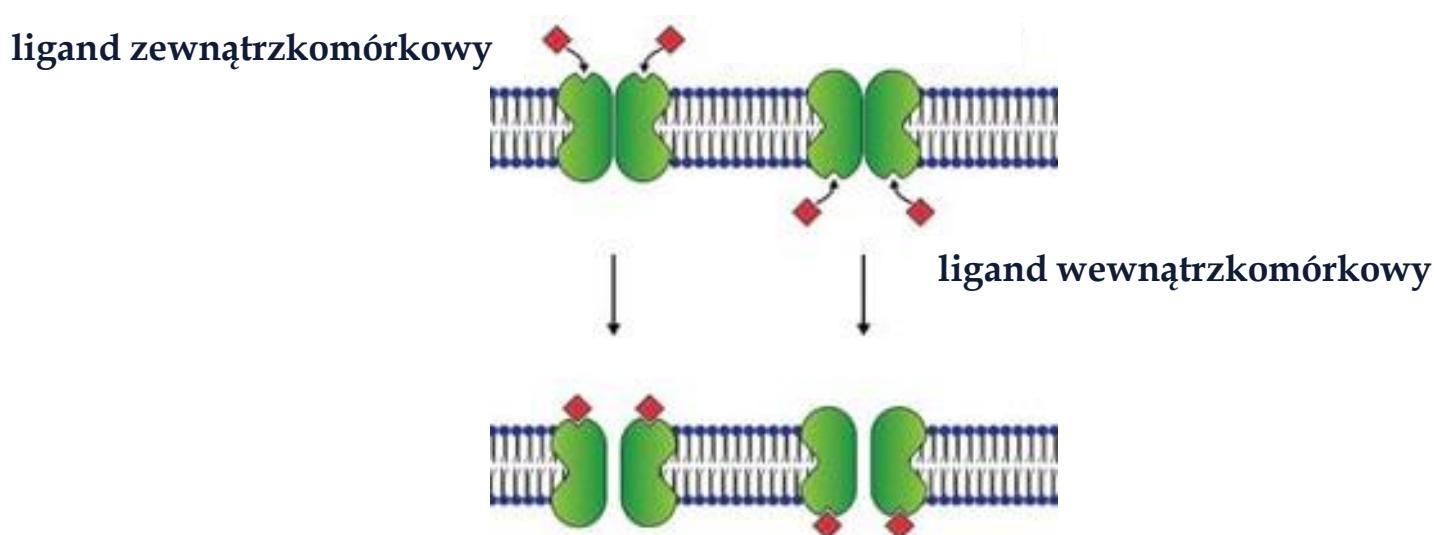
# Regulacja transportu przez białka błonowe

## Bramkowanie ligandem zewnątrzkomórkowym

- > przekazywanie do wnętrza komórki sygnałów ze środowiska zewnętrznego
- > miejsce receptorowe kanału wiąże cząsteczkę sygnalową, co wywołuje zmiany konformacyjne prowadzące do jego otwarcia
- > wiązanie cząsteczki sygnalowej jest odwracalne (oddysocjowanie cząsteczki powoduje zamknięcie kanału)

## Bramkowanie ligandem wewnętrzkomórkowym

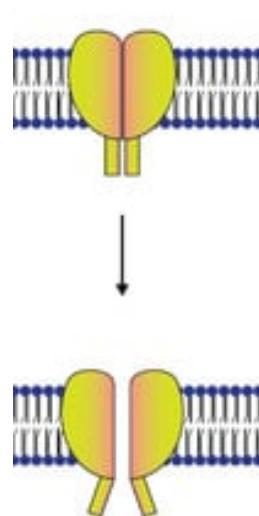
- > uruchomienie transportu jest odpowiedzią na sygnał pochodzący z wnętrza komórki



# Regulacja transportu przez białka błonowe

## Bramkowanie naprężeniami mechanicznymi

- > otwieranie/zamykanie kanału jest uzależnione od naprężen mechanicznych występujących w błonie (współdziałanie z włóknami białkowymi zlokalizowanymi pod błoną komórkową – elementy cytoszkieletu)
- > obserwowany m.in. w receptorach dotyku

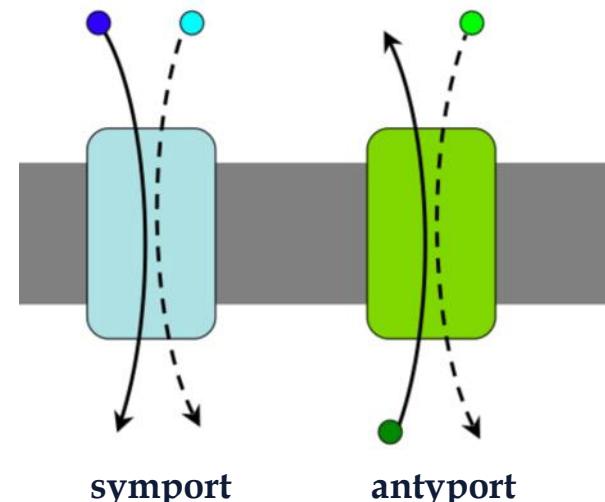


# Transport aktywny

- Zachodzi wbrew gradientowi stężeń
- Wymaga udziału specjalnych (transporterów) oraz nakładu energii nośników
- Szybkość transportu jest limitowana przez „dostępność” nośników
- Źródła energii dla transportu aktywnego:
  - Przepływ innej substancji zgodnie z gradientem stężenia (transport sprzężony)
  - Energia pochodząca z hydrolizy wiązań wysokoenergetycznych (ATP)
  - Kwanty światła (fotosynteza)

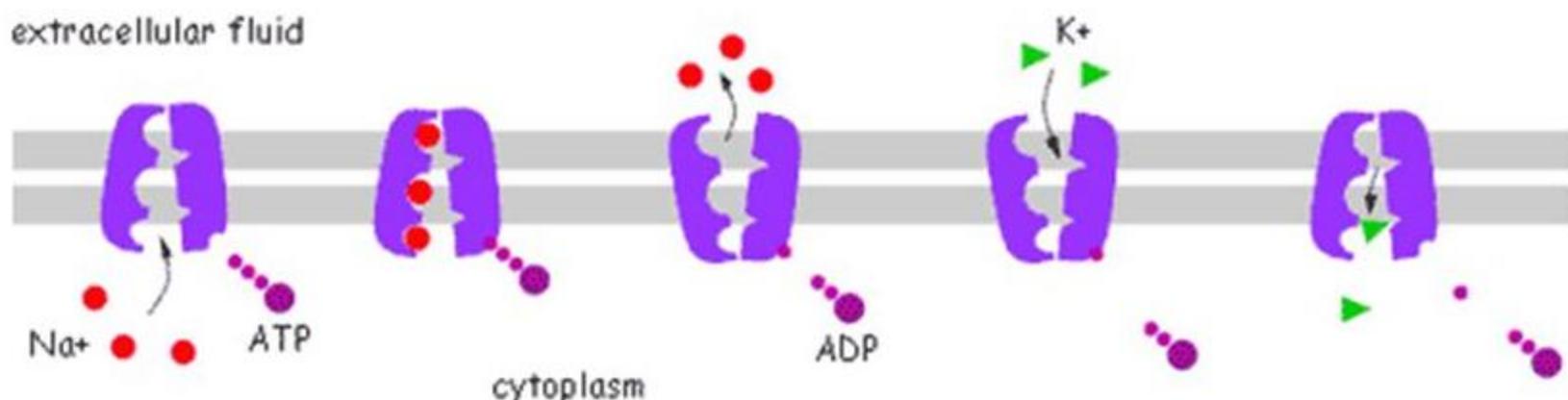
# Transport sprzężony

- Siła napędowa: przepływ drugiej substancji zgodnie z dużym gradientem stężenia
- Symport: substancja transportowana i substancja towarzysząca przepływają w tym samym kierunku
- Antyport: kierunki przepływu substancji transportowanej i substancji towarzyszącej są przeciwne
- Przykład: transport glukozy napędzany gradientem jonów sodu



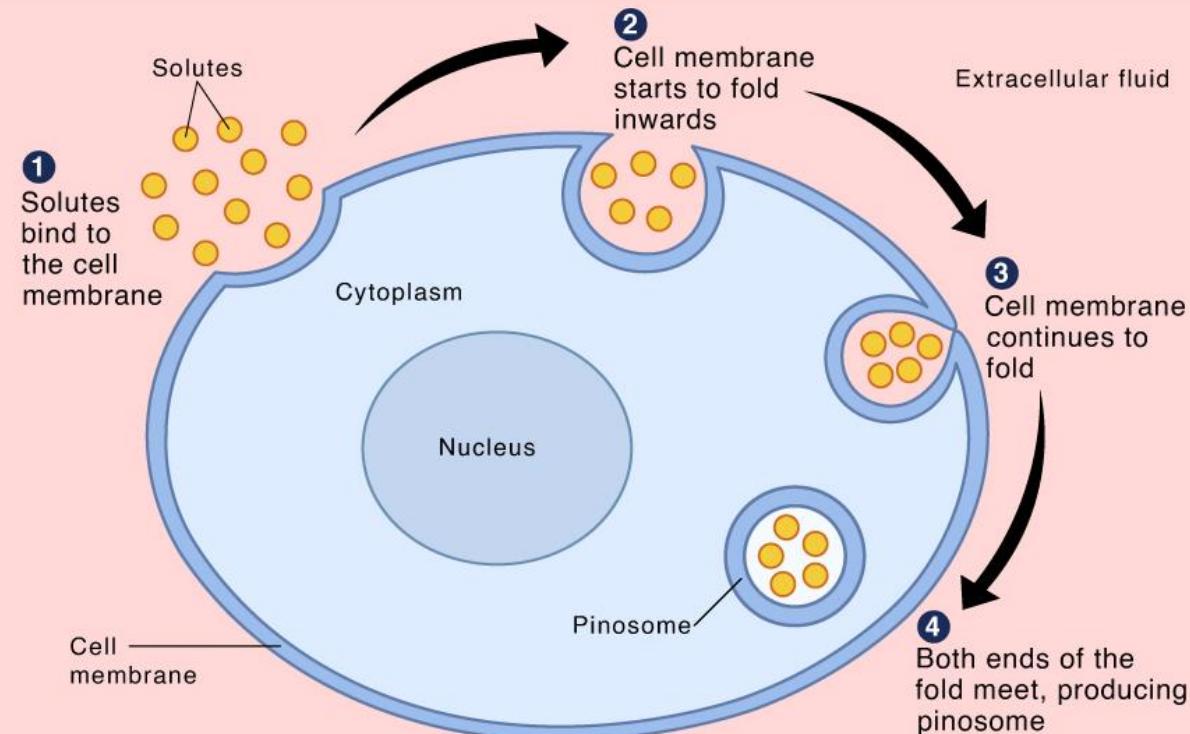
# Pompy błonowe

- Do transportu cząsteczek wykorzystywana jest energia chemiczna (najczęściej pochodząca z rozkładu cząsteczek ATP)
- Przykład: **pompa sodowo-potasowa**
  - Transportuje kationy sodu ( $\text{Na}^+$ ) i potasu ( $\text{K}^+$ )
  - Obydwa jony transportowane są wbrew gradientowi stężeń
  - Utrzymuje potencjał błonowy i objętość komórki
  - Zbudowana z dwóch podjednostek ( $\alpha$  i  $\beta$ )
  - Powstały gradient sodowo-potasowy jest niezbędny dla pobudzenia nerwów i mięśni
  - Powstały gradient sodowo-potasowy – siła napędowa transportu aktywnego cukrów i aminokwasów



# Transport pęcherzykowy

- Endocytoza – transport do wnętrza komórki (np. pochłanianie bakterii przez białe krwinki – makrofagi)
- Egzocytoza – transport na zewnątrz komórki (np. wydzielanie hormonów i enzymów przez komórki trzustki)
- Służy transportowi dużych cząstek
- Substancje są transportowane w pęcherzykach transportowych powstających z fragmentów błon

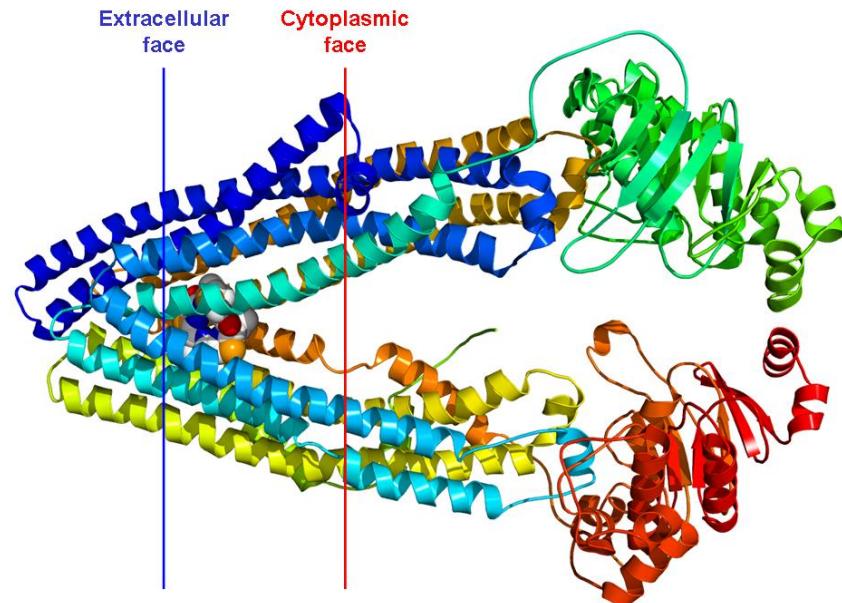


# Transport leków przez błony biologiczne

- Z punktu widzenia farmakokinetyki leków, najważniejszymi sposobami transportu leków przez błony są: dyfuzja bierna oraz transport przenośnikowy
- większość transporterów dla leków należy do rodziny białek ABC (energia do transportu pochodzi głównie z ATP)
- Działanie transporterów może ulec modyfikacji w przypadku jednoczesnego stosowania kilku leków
- Białka transportowe mogą wpływać na interakcje leków
- Substancje niezdysocjowane rozpuszczają się lepiej w lipidach niż substancje zdysocjowane (większość leków jest słabymi kwasami lub zasadami, więc ich dysocjacja jest uzależniona do pH środowiska) -> szybkość dyfuzji substancji leczniczej o charakterze słabego kwasu lub słabej zasady jest proporcjonalna do stężenia niezdysocjowanej formy substancji obecnej po obu stronach błony biologicznej
- Substancje o charakterze słabych kwasów są lepiej wchłaniane w środowisku kwaśnym, substancje o charakterze słabych zasad są lepiej wchłaniane w środowisku zasadowym; modyfikacja wchłaniania może nastąpić wskutek zmiany pH, np. podania środków zubojetniających

# Przykład białka transportowego ABC: glikoproteina P (P-gp)

- usuwa substancje obce z organizmu (w tym leki) z wnętrza komórek - zapobiega to ich kumulacji oraz utrudnia osiąganie docelowych miejsc działania
- jako przedstawiciel rodziny białek ABC posiada wysoce zakonserwowanego motyw zwany kasetą wiążącą ATP (ang. *ATP-binding cassette*)
- Zwyczajowo nazywana jest też białkiem oporności wielolekowej 1 (MDR1, z ang. multidrug resistance protein 1) ze względu na związek z lekoopornością linii komórek nowotworowych, w których ulega nadekspresji
- białko o symetrycznej budowie: każda połowa składa się z hydrofobowej domeny transbłonowej (TMD, ang. *transmembrane domain*) oraz hydrofilowej domeny wiążącej nukleotyd (NBD, ang. *nucleotide-binding domain*) znajdującej się po cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej. Każdy element TMD zbudowany jest z 6 segmentów transbłonowych o strukturze  $\alpha$  helisy.



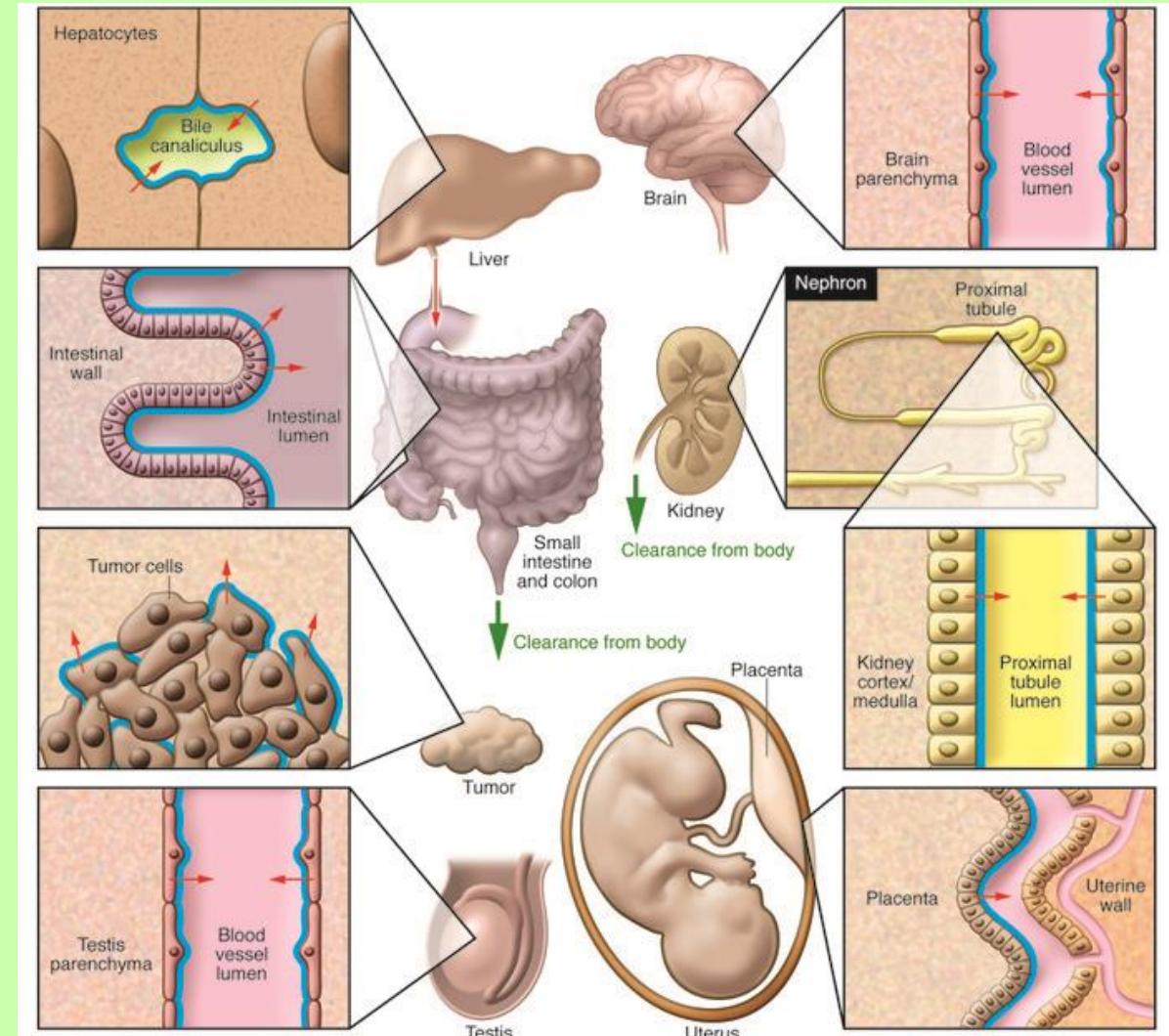
[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fe/MDR\\_3\\_3g5u.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fe/MDR_3_3g5u.png)

- mechanizm działania: hydrofobowa pompa próżniowa: substrat znajdujący się w cytoplazmie lub w wewnętrznej warstwie błony komórkowej oddziałuje z białkową kieszenią wiążącą lek, a następnie dzięki energii powstałej z hydrolizy ATP jest transportowany z do przestrzeni zewnątrzkomórkowej

# Lokalizacja glikoproteiny P w organizmie

Borst, P.; Schinkel, A. H. P-glycoprotein ABCB1: a major player in drug handling by mammals *J Clin Invest.* 2013;123(10):4131-4133

Odkrycie P-glikoproteiny w niektórych komórkach nowotworowych dało początek badaniom nad inhibitorami P-glikoproteiny (np. valspodar; ich celem jest zwiększenie penetracji cytostatyków do komórek nowotworowych)



Niebieskie linie wskazują na rozmieszczenie glikoproteiny P, czerwone strzałki ilustrują kierunek transportu wspomaganego przez glikoproteinę P.

# Przykłady leków podlegających transportowi przez glikoproteinę P

- **przeciwnowotworowe** (daktynomycyna, doksorubicyna, mitomycyna, paklitaksel, winblastyna, winkrystyna)
- **immunosupresyjne** (cyklosporyna A, kwas mykofenolowy, sirolimus, takrolimus)
- **antybiotyki** (erytromycyna, klarytromycyna, lewofloksacyna, rifampicyna, sparfloksacyna, tetracykлина)
- **leki obniżające ciśnienie krwi** (celiprolol, losartan, talinolol)
- **leki przeciwddepresyjne** (fluoksetyna, paroksetyna, sertralina)
- **leki przeciwwirusowe** (amprenawir, indinawir, nelfinawir, ritonawir)
- **leki przeciwbólowe** (morfina)
- **leki przeciwaretmiczne** (amiodaron, digoksyna, propafenon, werapamil)
- **leki przeciwbiegunkowe** (loperamid)
- **leki przeciwwymiotne** (domperidon, ondansetron)

# Lipofilowość jako cecha wpływająca na transport leków przez błony biologiczne

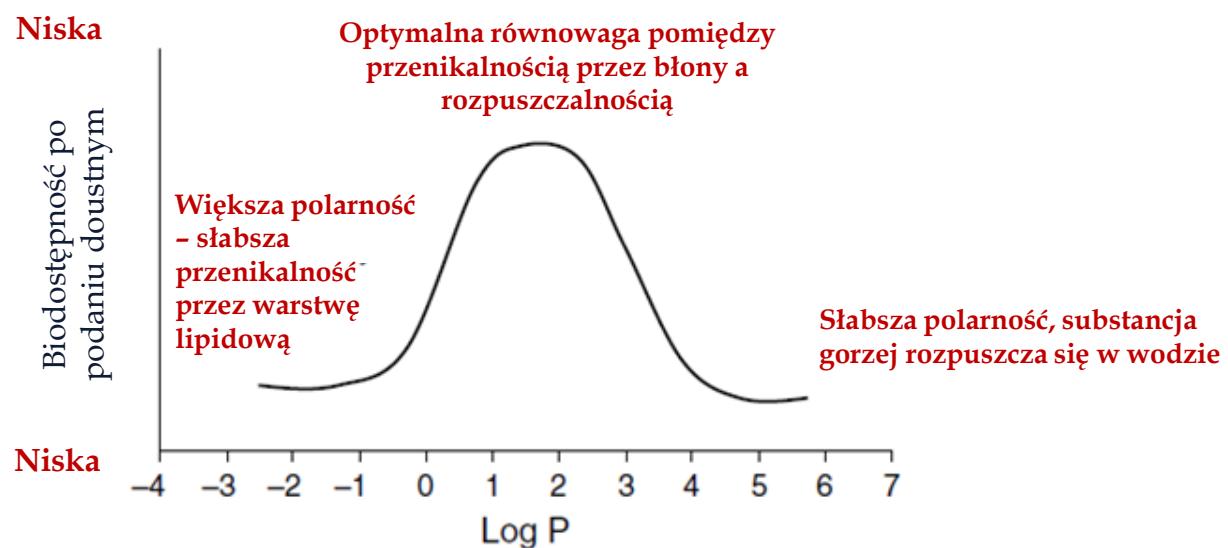
## Lipofilowość:

- wpływa na transport cząsteczek przez błony
- wpływa na zdolność tworzenia kompleksów z receptorami
- wpływa na zdolność tworzenia kompleksów z białkami osocza krwi
- wyraża powinowactwo cząsteczki lub ugrupowania chemicznego do środowiska lipofilowego
- stanowi miarę zdolności cząsteczek związku chemicznego do rozpuszczania się w tłuszczach, olejach oraz rozpuszczalnikach niepolarnych
- umożliwia przewidywanie profilu wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania
- wg. IUPAC lipofilowość jest opisywana poprzez zjawisko podziału pomiędzy dwie niemieszące się fazy, zarówno w układzie ciecza-ciecza (np. oktanol/woda) jak i ciało stałe/ciecza (w przypadku metod chromatograficznych); ilościowo wyrażana jako współczynnik podziału P (najczęściej podawany w skali logarytmicznej: logP)
- współczynnik podziału P - stosunek stężeń substancji S w fazie niepolarnej (organicznej) i polarnej (głównie wodnej) w stanie równowagi

$$\log P = \log \frac{[S_{oktanol}]}{[S_{woda}]}$$

# LogP jako miara biodostępności substancji

- Optymalne wchłanianie z przewodu pokarmowego poprzez dyfuzję bierną – umiarkowane logP (zakres ~0–3)



# LogP vs. droga wchłaniania leku

- Lek po dostaniu się do organizmu napotyka dwa konkurencyjne środowiska: lipofilowe błon komórkowych oraz lipofobowe (cytoplazma)
- Cytoplazma komórkowa – rozcieńczony wodny roztwór soli (wysoka polarność)
- Dla odpowiedniej aktywności leku istotne jest zachowanie równowagi hydrofilowo-hydrofobowej

**Tabela 1.** Współczynnik podziału w zależności od drogi podania leku

Droga podania leku	LogP
Leki działające w ośrodkowym układzie nerwowym	$2.0 \pm 1$
Leki doustne	0-3
Podanie doodbytnicze	~1.3
Podanie podjęzykowe	~5.5
Wchłanianie przez skórę	3-4

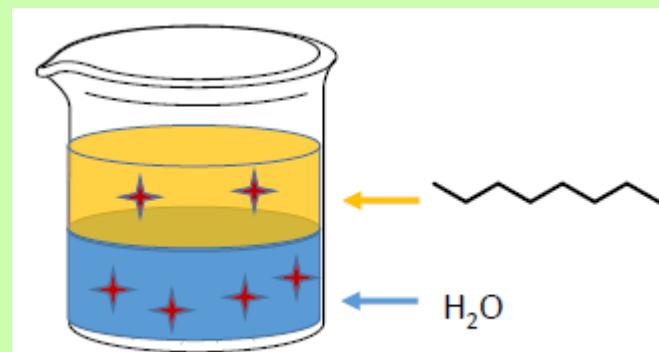
# Wyznaczanie logP

- eksperymentalne:

- klasyczna metoda ekstrakcyjna w układzie oktanol-woda (shake-flask)
- metoda RP-TLC - chromatografia cienkowarstwowa w odwróconym układzie faz (ew. RP-HPLC)
- metody elektrochemiczne

- Teoretyczne:

- metody oparte na fragmentach cząsteczek gdzie określonym fragmentom, tzn. atomom lub grupom atomów, przyporządkowane są pewne doświadczalnie wyznaczone wartości, których suma stanowi całkowitą wartość  $\log P$  cząsteczki
- metody atomowe: każdy atom charakteryzuje pewną stałą - wkład w całkowitą lipofilowość cząsteczki
- metody oparte na właściwościach całych cząsteczek, w których na podstawie obliczonych kwantowo-mechanicznie energii solwatacji cząsteczki w fazie wodnej i organicznej wyznacza się wartość  $\log P$



# Teoretyczne wyznaczanie logP

Podejście Hanscha – założenia:

- Stały wpływ określonych podstawników na logP -> niezależny od struktury bazowej i od obecności innych podstawników (addytywny charakter podstawników)
- Wyznaczenie stałej lipofilowości  $\pi$  dla każdego podstawnika:

$$\pi = \log P_X - \log P_H$$

$P_X$  – współczynnik podziału związku podstawionego

$P_H$  - współczynnik podziału związku niepodstawionego

**Tabela 2.** Wartości stałych  $\pi$  dla najbardziej popularnych podstawników.

Podstawnik	$\pi$	Podstawnik	$\pi$	Podstawnik	$\pi$
Br	0.86	CH <sub>2</sub> OH	-1.03	CH <sub>2</sub> COOH	-0.72
CH <sub>3</sub>	0.50	CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	-1.04	CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	-1.68
CH <sub>2</sub>	0.50	CHO	-0.65	etyl	1.02
CF <sub>3</sub>	0.88	COCH <sub>3</sub>	-0.55	propyl	1.55
CN	-0.57	CONH <sub>2</sub>	-1.49	fenyl	1.89

# Teoretyczne wyznaczanie logP

## Metoda Nysa i Rekkera

- o nie wyróżnia struktury bazowej i podstawników, cała struktura jest traktowana jako złożona z fragmentów
- o każdy fragment wnosi addytywnie swój wkład do końcowej wartości logP

$$\log P = \sum_{i=1}^n a_i f_i$$

$f_i$  – stała hydrofobowa fragmentu  $i$

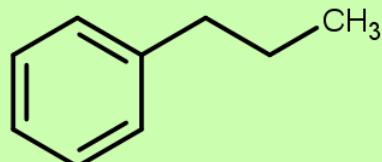
$a_i$  – liczba wystąpień fragmentu  $i$  w cząsteczce

n – całkowita liczba fragmentów w cząsteczce

# Przykładowe stałe hydrofobowe wyznaczone przez Nysa i Rekkera

Fragment	$f_{\text{alif.}}$	$f_{\text{aromat.}}$	Fragment	$f_{\text{alif.}}$	$f_{\text{aromat.}}$
CH	0.236	0.236	CN	-1.13	-0.20
CH <sub>2</sub>	0.527	0.527	OH	-1.440	-0.374
F	-0.51	0.425	OCH <sub>3</sub>	-0.834	0.244
Cl	0.06	0.930	NH <sub>2</sub>	-1.380	-0.911
Br	0.24	1.169	NO <sub>2</sub>	-1.06	-0.089
J	0.59	1.456	COOH	-1.003	0.000
CH=C	0.51	0.51	CONH <sub>2</sub>	-1.99	-1.26
			fenyl		1.896

Przykład: n-propylobenzen



$$\log P = f(\text{fenyl}) + 2f(\text{CH}_2) + f(\text{CH}_3) = 1.896 + 2 \cdot 0.527 + 0.702 = 3.65$$

Wartość doświadczalna: 3.69

# CLogP

- algorytm bazujący na podejściu Nysa i Rekkera
- uwzględnia czynnik korygujący  $e$

$$\log P = \sum_{i=1}^n a_i f_i + \sum_{j=1}^k e_j n_j$$

# PROLOGP (Ghose Krippen) - podejście atom-based

type	description <sup>a</sup>	hydrop <sup>b</sup>	no. of compounds	freq of use	atomic refrac	no. of compounds	freq of use
C in							
1	:CH <sub>3</sub> R, CH <sub>4</sub>	-0.6771	385	589	2.9680	283	495
2	:CH <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	-0.4873	245	506	2.9116	169	389
3	:CHR <sub>3</sub>	-0.3633	46	51	2.8028	33	37
4	:CR <sub>4</sub>	-0.1366	24	24	2.6205	11	11
5	:CH <sub>3</sub> X	-1.0824	196	299	3.0150	76	114
6	:CH <sub>2</sub> RX	-0.8370	302	485	2.9244	199	320
7	:CH <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	-0.6015	6	6	2.6329	14	15
8	:CHR <sub>2</sub> X	-0.5210	87	152	2.5040	42	51
9	:CHR <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	-0.4042	36	36	2.3770	15	19
10	:CHX <sub>3</sub>	0.3651	4	4	2.5559	5	5
11	:CR <sub>3</sub> X	-0.5399	15	15	2.3030	15	16
12	:CR <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	0.4011	3	3	2.3006	16	25
13	:CRX <sub>3</sub>	0.2263	36	38	2.9627	12	15
14	:CX <sub>4</sub>	0.8282	6	6	2.3038	4	4
15	::CH <sub>2</sub>	-0.1053	25	31	3.2001	38	44
16	::CHR	-0.0681	48	70	4.2654	44	56
17	::CR <sub>2</sub>	-0.2287	9	10	3.9392	7	7
18	::CHX	-0.3665	23	24	3.6005	11	11
19	::CRX	-0.9188	13	13	4.4870	14	16
20	::CX <sub>2</sub>	-0.0082	5	6	3.2001	8	12
21	::CH	-0.1047	3	4	3.4825	12	13
22	::CR, R=C=R	0.1513	4	5	4.2817	18	23
23	::CX				3.9556	7	7
24	:R--CH--R	0.0068	584	2222	3.4491	187	896
25	:R--CR--R	0.1600	307	371	3.8821	107	144
26	:R--CX--R	-0.1033	432	737	3.7593	102	156
27	:R--CH--X	0.0598	92	142	2.5009	14	16
28	:R--CR--X	0.1290	66	73	2.5000	14	15
29	:R--CX--X	0.1652	70	85	3.0627	4	4
30	:X--CH--X	0.2975	23	23	2.5009	1	1
31	:X--CR--X	0.9421	7	7			
32	:X--CX--X	0.2074	14	14	2.6632	1	3
33	:R--CH...X	-0.1774	16	19	3.4671	19	22
34	:R--CR...X	-0.2782	39	44	3.6842	13	14
35	:R--CX...X	-0.3630	7	8	2.9372	4	5

# Porównanie podejść teoretycznych do oceny logP

Petrauskas, A.A., Kolovanov, E.A. ACD/Log P method description. *Perspectives in Drug Discovery and Design* 19, 99–116 (2000)

Table 1. Classification of Log P calculation methods according to Mannhold [1]

Method	Classification	Program	N(f)	N(F)	R
This work	Fragmental	ACD/Log P	553	>2000 <sup>a</sup>	0.9859
Meylan–Howard [2]	Fragmental	KOWWIN, LOGKOW	>100	>200	0.9546
Klopman [3]	Fragmental	KLOGP	68	30	0.9511
Rekker [4,5], extended	Fragmental	SANALOGP_ER	>100	>20	0.9410
Hansch–Leo [6–9]	Fragmental	CLOGP 4.34	>100	>50	0.9357
Rekker [4,5], revised	Fragmental	ΣFSYBYL	>100	>20	0.9215
Rekker [10–13], original	Fragmental	PROLOGP cdr	>100	>20	0.9186
Combined [12] and [14]	Fragmental/atom	PROLOGP comb	>100	>20	0.9112
Dubbost [15]	Atom-based	SMILOGP	?	—	0.9072
Ghose–Crippen [14,16–18]	Atom-based	PROLOGP atom	>100	—	0.9033
Ghose–Crippen [14,16–18]	Atom-based	TSAR 2.2	>100	—	0.8976
Suzuki–Kudo [19]	Atom-based	CHEMICALC-2	424	—	0.8897
Ghose–Crippen [14,16–18,20]	Atom-based	MOLCAD	>100	—	0.8813
Abraham–Kellogg [21]	Atom-conform	HINT	?	—	0.8672
Ulmschneider [22]	Conform-based	ASCLOGP	?	—	0.8535

1. Mannhold, R. and Dross, K., Quant. Struct.-Act. Relat., 15 (1996) 403.
2. Meylan, W. and Howard, P., J. Pharm. Sci., 84 (1995) 83.
3. Klopman, G., Li, J.-Y., Wang, S. and Dimayuga, M., J. Chem. Inf. Comput. Sci., 34 (1994) 752.
4. Rekker, R.F. and Mannhold, R., Calculation of Drug Lipophilicity, VCH, Weinheim, 1992.
5. Chou, J. and Jurs, P.C., J. Chem. Inf. Comput. Sci., 19 (1979) 172.
6. Leo, A., Jow, P.Y.C., Silipo, C. and Hansch, C., J. Med. Chem., 18 (1975) 865.
7. Hansch, C. and Leo, A., Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, Wiley, New York, NY, 1979.
8. Leo, A.J., Chem. Rev., 93 (1993) 1281.
9. Hansch, C., Leo, A. and Hoekman, D., Exploring QSAR. Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants, American Chemical Society, Washington, DC, 1995.
10. Nys, G.G. and Rekker, R.F., Chim. Ther., 8 (1973) 521.
11. Nys, G.G. and Rekker, R.F., Eur. J. Med. Chem., 9 (1974) 361.
12. Rekker, R.F., The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacopharmacology Library, Vol. 1, Elsevier, Amsterdam, 1977.
13. Rekker, R.F. and de Kort, H.M., Eur. J. Med. Chem., 14 (1979) 479.
14. Viswanadhan, V.N., Ghose, A.K., Revankar, G.R. and Robins, R.K., J. Chem. Inf. Comput. Sci., 29 (1989) 163.
15. Convard, T., Dubost, J.-P., Le Solleu, H. and Kummer, E., Quant. Struct.-Act. Relat., 13 (1994) 34.
16. Ghose, A.K. and Crippen, G.M., J. Comput. Chem., 7 (1986) 565.
17. Ghose, A.K. and Crippen, G.M., J. Chem. Inf. Comput. Sci., 27 (1987) 21.
18. Ghose, A.K., Pritchett, A. and Crippen, G.M., J. Comput. Chem., 9 (1988) 80.
19. Suzuki, T. and Kudo, Y., J. Comput.-Aided Mol. Design, 4 (1990) 155.
20. Brickmann, J. and Waldherr-Teschner, M., Informationstechnik, 33 (1991) 83.
21. Kellogg, G.E. and Abraham, D., J. Comput.-Aided Mol. Design, 5 (1991) 545.
22. Ulmschneider, M., Ph.D. Thesis, University of Haute-Alsace, Mulhouse, France, 1993.

R is the correlation coefficient obtained by correlating experimental Log P values of 48 drugs from Reference 1. N(f) and N(F) are the numbers of fragmental constants and correction factors in Equation 1.

# SLIPPER - Solubility, LIPophilicity, PERmeability

- podejście empiryczne
- przewidywanie uwzględnia czynnik steryczny oraz przyczynek związany z oddziaływaniami (np. dipol-dipol czy wiązania wodorowe)
- uwzględnia zależność logP od pH
- wykorzystuje fragmenty sferyczne tworzone jako sfery o określonym promieniu wokół wybranego atomu (każdy atom w rozpatrywanej cząsteczce jest wybierany jako centrum sfer)
- rozmiar zbioru uczącego: 10 937 struktur
- ustalenie promienia sfer na 5 (odległość topologiczna) powoduje utworzenie 140 170 fragmentów
- ostatecznie ustalono promień sfer na 2 (w ten sposób utworzono 10364 fragmentów)

Raeovsky OA, Trepalin SV, Trepalina HP, Gerasimenko VA, Raevskaja OE. SLIPPER-2001 -- software for predicting molecular properties on the basis of physicochemical descriptors and structural similarity. J. Chem. Inf. Comput. Sci. 2002 May-Jun;42(3), 540-549.

# Metody wykorzystujące strukturę 3D związku

- metody bazujące na obliczeniach kwantowo-mechanicznych:
  - BLOGP
  - QLOGP (wykazano wpływ wielkości cząsteczki na logP)
  - GBLOGP (podejście oparte na metodach solwacyjnych)
  - COSMO - RS (Continuum Solvation Model for Real Solvents)
  - metody *ab initio* (optymalizacja geometrii i wyznaczanie potencjału elektrostatycznego *ab initio* (bardzo czasochłonne))
- metody wykorzystujące dynamikę molekularną:
  - przykład:  $\log P = 0.0145ASA - 0.731HBAC - 1.064NA + 1.172NN - 1.772$

ASA – powierzchnia cząsteczki dostępna dla rozpuszczalnika

HBAC – liczba akceptorów wiązania wodorowego

NA – liczba grup aminowych w cząsteczce

NN – liczba grup nitrowych w cząsteczce

# Metody wykorzystujące deskryptory topologiczne

- Zaleta: szybkość obliczeń
- MLOGP (Moriguchi et al. Moriguchi , I. , Hirono , S. , Liu , Q. , Nakagome , I. , Matsushita , Y. Simple method of calculating octanol/water partition coefficient. *Chem. Pharm. Bull.* **1992** , 40 , 127 - 130); dwa podstawowe deskryptory w algorytmie MLOGP: suma lipofilowych (węgiel i halogeny) i hydrofilowych atomów (azot i tlen) + 11 przyczynków korygujących
- TLOGP (Junghans , M.; Pretsch , E. Estimation of partition coefficients of organic compounds: local database modeling with uniform - length structure descriptors. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1997** , 359 , 88 - 92)
- Metody wykorzystujące deskryptory stanu elektrotopologicznego, E-state indices: VLOGP, ALOGPS, CSLOGP

# Ocena skuteczności poszczególnych metod

- Dane: 284 cząsteczki z książki dataset of Avdeef: Avdeef , A. Absorption and Drug Development. Solubility, Permeability and Charge State. Wiley - Interscience, Hoboken, 2003 (dane literaturowe + dane z eksperymentów przeprowadzonych bezpośrednio przez autorów)
- BioByte StarList - złoty standard do oceny skuteczności predykcji logP (Leo , A. J. *The MedChem Database* , BioByte Corp. and Pomona College, Daylight Chemical Information Systems , Mission Viejo, CA , 2003)
- Pokrywanie się cząsteczek - utworzenie dwóch podzbiorów „star” i „non-star”

# Ocena skuteczności poszczególnych metod

Tab. 15.2 Performance of algorithms.

Method	Star (234)		Non-Star (50)		Zwitterions (18)		Other (266)
	MAE	Rank <sup>1</sup>	MAE	Rank	MAE	AE	
A_S+logP	0.33	I	0.7	I	0.4	-0.01	0.4
ALOGPS <sup>2</sup>	0.39	I	0.7	I	0.64	-0.51	0.44
VLOGP <sup>3</sup>	0.50 (0.41)	II	0.95 (0.84)	I, III	0.87 (0.69)	-0.8 (-0.62)	0.56 (0.47)
SLIPPER	0.58	II	0.91	I, III	1.2	-1.14	0.6
QikProp	0.58	II	1.01	III	0.83	-0.48	0.64
CSlogP	0.61	II	0.95	I, III	0.54	-0.06	0.68
TLOGP <sup>4</sup>	0.64	II	1.01	III	1.26	-0.97	0.69
ABSOLV	0.65	II	0.94	I, III	1.98	-1.97	0.61
QuantlogP	0.7	II	1.03	III	1.91	-1.9	0.68
QLOGP	0.72	II	1.19	III	0.9	-0.24	0.79
VEGA <sup>5</sup>	0.8	III	1.07	III	1.53	0.95	0.8
CLIP <sup>6</sup>	0.82	III	1.27	III	1.3	-0.95	0.87
LSER	0.87	III	1.26	III	2.32	-2.31	0.84
MLOGP	0.93	III	1.12	III	1.64	-1.51	0.92
SPARC <sup>7,8</sup>	0.93	III	1.17	III	0.72	0.06	0.99
COSMOFrag <sup>2</sup>	1.13	III	1.38	IV	2.48	-2.47	1.09
LSE UFZ <sup>7</sup>	1.19	IV	2.15	IV	2.32	-1.75	1.29
GBLOGP <sup>6</sup>	1.25	IV	1.76	IV	2.51	2.46	1.26
HINT <sup>5</sup>	1.27	IV	1.87	IV	1.25	0.54	1.39
AAM	1.37	IV	1.87	IV	2.96		1.36

MAE – mean absolute error

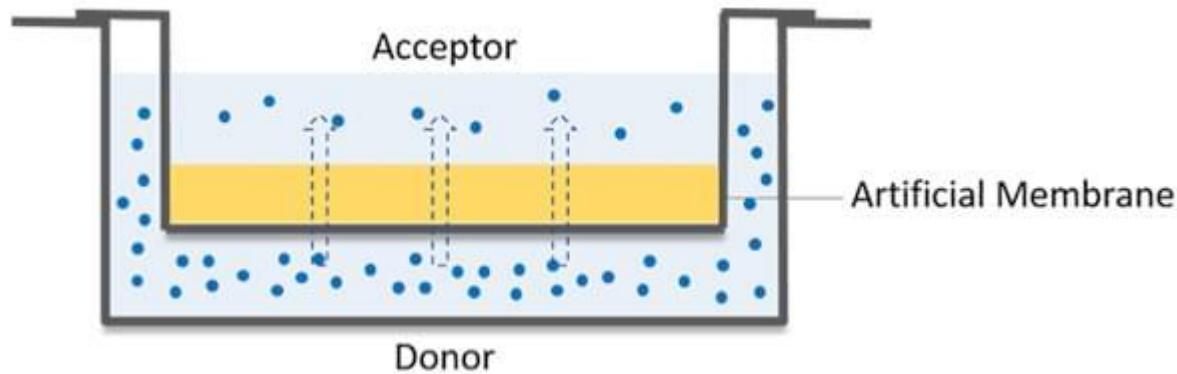
## „Rank” definitions:

Methods that produced results not significantly different from the method with the minimal MAE received rank I, i.e. all methods with rank I had a similar “best” performance. After determination of this group, the remaining methods with results significantly better than those of MLOGP or AAM received rank II and III, respectively. Methods that had an MAE non - significantly different from (or even worse than) AAM received rank IV

Tetko, I. V.; Poda, G., I. Molecular Drug Properties. Measurement and Prediction. R. Mannhold (Ed.) 2008 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

# Badanie procesu wchłaniania *in vitro*

- Tworzenie modeli *in vitro* uwzględnia możliwość zbadania wpływu lipidowej części błony komórkowej i pH środowiska
- Najczęściej wykorzystuje się naczynie z umieszczoną w nim błoną



<https://www.creative-bioarray.com/Services/pampa-assay.htm>

- Coraz większą rolę w badaniach wchłanalności i przepuszczalności przez błony *in vitro* zyskują w ostatnich latach również techniki oparte o hodowle komórkowe, np. linia Caco-2

# Linia komórkowa Caco-2

- Linia komórkowa Caco-2: linia komórkowa ludzkiego raka nabłonka okrężnicy
- Linia komórkowa Caco-2 jest uważana za odpowiednik enterocytów jelita cienkiego
- Komórki Caco-2 wytwarzają enzymy i białka transportowe, a także P-glikoproteinę i białka oporności wielolekowej
- Podstawowa różnica w stosunku do normalnych komórek jelitowych: brak ekspresji enzymów cytochromu P450, w szczególności CYP3A4, który jest obecny w dużym stężeniu w komórkach jelita -> obecność CYP3A4 w komórkach Caco-2 może być wyindukowana dodatkiem witaminy D3

# Linia komórkowa Caco-2

- Przepuszczalność wyraża się przez pozorny współczynnik przepuszczalności (apparent permeability coefficient ( $P_{app}$ )):

$$P_{app} = V_r \cdot \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{A \cdot C_0}$$

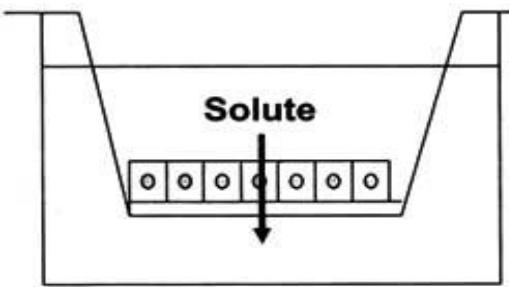
$V_r$  - objętość kompartmentu, do którego transportowany jest związek

$\frac{dQ}{dt}$  - zmiana stężenia związku w badanym kompartmencie w czasie

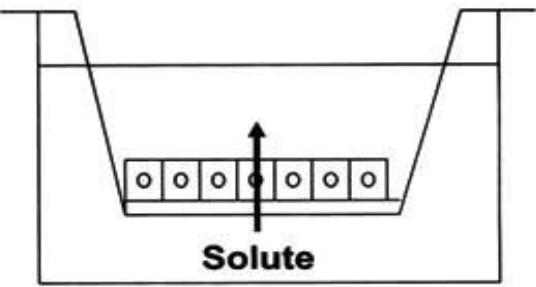
$A$  - powierzchnia błony

$C_0$  - wyjściowe stężenie związku w kompartmencie, w którym był umieszczony początkowo

Roztwór jest umieszczany po apikalnej stronie monowarstwy komórek Caco-2. Mierzona jest szybkość pojawiania się badanych związków po stronie podstawnej. Opcjonalnie, badany związek można dodać po stronie podstawnej w celu zbadania ewentualnej obecności transportu aktywnego.



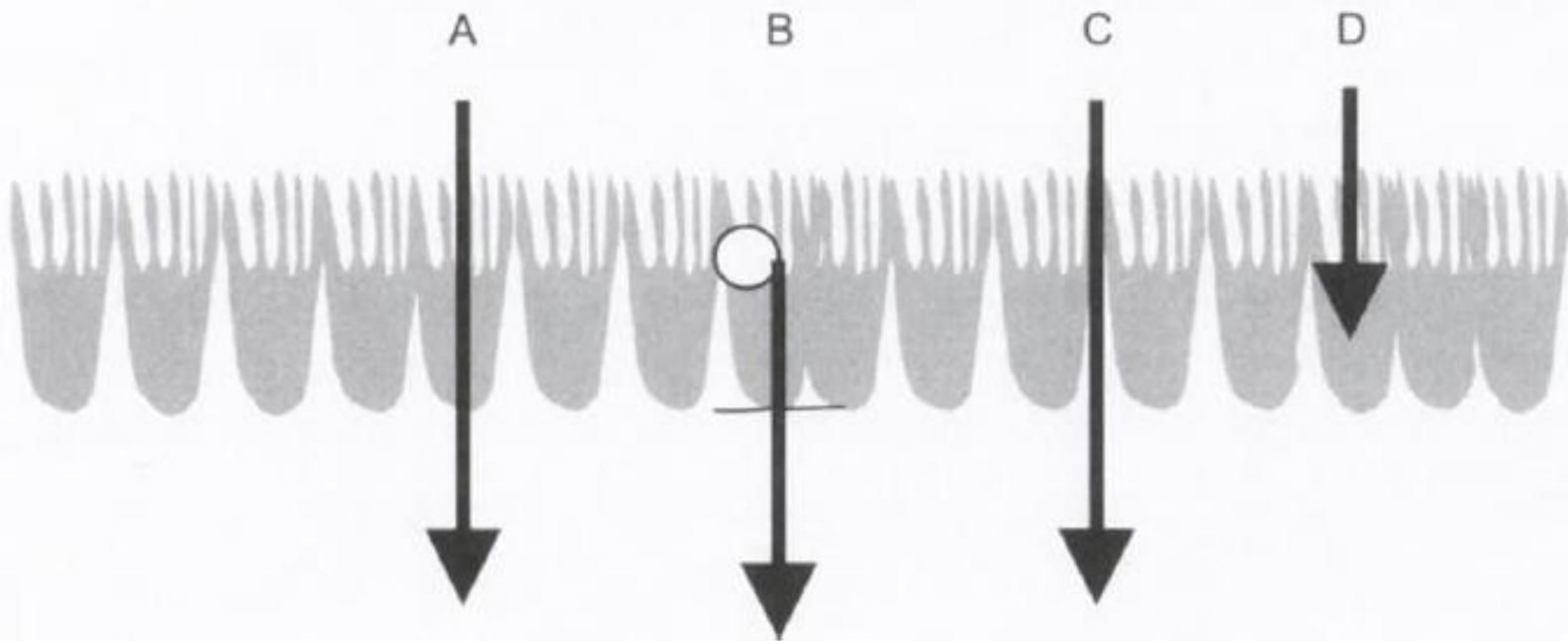
**AP-to-BL transport**



**BL-to-AP transport**

Li Y, Shin YG, Yu C, et al. Increasing the throughput and productivity of Caco-2 cell permeability assays using liquid chromatography-mass spectrometry: application to resveratrol absorption and metabolism. Comb Chem High Throughput Screen. 2003;6(8):757-767.

# Schemat transportu substancji przez warstwę komórek nabłonkowych *in vitro*



A - bezpośredni transport transkomórkowy.

B - transport transkomórkowy za pomocą nośnika/transportera.

C - transport międzykomórkowy.

D - akumulacja składnika wewnętrz komórki lub rąbka szczoteczkowego.

# Przykłady linii komórek nabłonkowych jelit

Nazwa linii	Pochodzenie	Charakterystyka
Caco-2	Gruczolakorak jelita grubego 72-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej	Najczęściej stosowana linia komórkowa w badaniach nad transportem transnabłonkowym, w czasie hodowli przechodzi proces spontanicznego różnicowania się, od strony apikalnej produkują niewielkie ilości śluzu jelitowego, do badań nad transportem nabłonkowym stosuje się kultury 21-dniowe
HT-29	Gruczolakorak jelita grubego 44-letniej kobiety	Morfologia typowa dla komórek nabłonkowych, tworzy duże ilości śluzu jelitowego
T84	Gruczolakorak (adenocarcinoma)	Pochodzi z przerzutu raka jelita grubego do płuc u 72-letniego mężczyzny. Posiada receptory dla szeregu hormonów peptydowych i neuroprzekaźników. Komórki rosną jako monowarstwy, wykazują ścisłe połączenia i desmosomy między sąsiednimi komórkami.
MDCK	Nabłonek psich nerek	Niska ekspresja systemu wydalniczego oraz białek transporterowych
IEC-18	Nabłonek jelita szczura	Relatywnie luźna struktura monowarstwy komórkowej, bardzo dobry model do badania transportu pasywnego przez przestrzeń międzykomórkową
2/4/A1	Nabłonek jelita płodu szczura	Najlepiej z wszystkich linii komórkowych imituje przepuszczalność ludzkiego nabłonka jelitowego, szczególnie w zakresie trzykomórkowego transportu pasywnego. Ma ona znacznie luźniejszą strukturę monowarstwy niż linia Caco-2.

# Protokół PAMPA

- nie wymaga użycia żywych komórek
- wykorzystuje membranę PVDF pokrytą roztworem wybranej substancji lipidowej
- efektywną przepuszczalność ( $P_e$ ) wyznacza się ze wzoru:

$$P_e = \frac{-\ln[1 - \frac{C_A}{C_e}]}{S \cdot (\frac{1}{V_D} + \frac{1}{V_A}) \cdot t}$$

$V_D$  – objętość w dołku donorowym

$V_A$  – objętość w dołku akceptorowym

$C_A$  – stężenie związku w dołku akceptorowym

$C_e$  – stężenie równowagowe między dwoma segmentami przy założeniu 100% przepuszczalności dla związku ( $C_e = \frac{C_D \cdot V_D - C_A \cdot V_A}{V_D - V_A}$ )

$S$  – powierzchnia membrany

$t$  – czas inkubacji