

AN OVERVIEW OF BIOAVAILABILITY IN SILICO PREDICTION

Victor BAERLE

West University of Timisoara, Faculty of Chemistry, Biology, Geography, Department of Biology-Chemistry, Pestalozzi 16, Timișoara

*Corresponding author e-mail: victor.baerle00@e-uvt.ro

Received 31 May 2020; accepted 23 December 2020

ABSTRACT

In this work, several concepts and features concerning oral bioavailability were discussed. It was illustrated how different parameters, especially physicochemical parameters, influence the bioavailability of drug-like compounds. Some rules of the oral bioavailability, such as Lipinski's Rule of 5 and others was analyzed, and it was shown that they are useful for fast-filtration of drug candidates, but their using should be correlated with other analyses, to predict intra- and inter- molecular interactions that affect absorption of biological compounds.

KEYWORDS: oral bioavailability; absorption; Lipinski's rule of 5; tautomerism.

Odată administrat, un compus este absorbit în stomac, duoden sau intestin, în dependență de pH-ul său isoelectric. Difuzând prin membrana celulară, acesta ajunge în sânge, unde se dizolvă sau este transportat de anumite proteine către țesutul țintă. Ulterior, compusul străbate membranele celulare fosfolipidice, prin difuziune simplă, sau transport direcționat. În farmacologie, biodisponibilitatea (BD) este o subcategorie a absorbției, reprezentând fracțiunea dozei administrate de medicament care ajunge în circulația sistemică (Hebert, 2013). Astfel, scorul de biodisponibilitate este un factor important în stabilirea dozelor de medicamente administrate, dar și în cadrul căutării *in-silico* a medicamentelor. Cercetarea computerizată a potențialilor compuși activi este un proces complex, care răspunde printre altele și la întrebarea despre biodisponibilitatea orală a acestora, cu scopul de a oferi prioritate în testare acelor substanțe care au o mai mare eficiență de penetrare a membranelor de la nivelul gastro-intestinal, respectiv de a ajunge în circuitul sanguin. Scorul BD se acordă prin analiza structurii chimice a compusului, respectiv a parametrilor fizico-chimici calculați sau preziși pentru substanța dată. Regulile biodisponibilității orale specifică intervale stabilite empiric, evaluând dependența BD a compușilor deja cunoscuți de parametrii fizico-chimici ai acestora.

Parametrii fizico-chimici determinați pe baza structurii chimice.

Structura chimică a potențialului medicament poate oferi informații calculabile *in-silico*, dacă se iau în calcul interacțiunile chimice și fizice dintre atomii constituenți, adică geometria moleculei, interacțiunea dintre atomii legați, interacțiunile dintre grupările adiacente de atomi, interacțiunea moleculei cu solventul ș.a.

Masa Moleculară (MM) reprezintă parametrul cel mai simplu de calculat. Relevanța acesteia ar putea fi explicată pornind de la prezumția că majoritatea atomilor constituenți ai moleculelor bioactive sunt nemetale cu masa moleculară mică, respectiv-prin faptul că o masă moleculară mare indică un număr mare de atomi, un compus voluminos, care difuzează greu prin membrana celulară. Pe de altă parte, Mm mare ar putea indica prezența în moleculă a atomilor cu masă atomică medie (S, P, Cl) sau mare (metale tranzitionale, I, As etc.), care manifestă raze mari Van der Waals, respectiv structura rezultată ar fi voluminoasă.

Coeficientul de partiție (logP) este un parametru calculat în funcție de prezența regiunilor hidrofobe (deci lipofile) în structura moleculei. Valorile pozitive ale acestuia permit difuziunea simplă prin membrana fosfolipidică. Totuși, la valori foarte mari ale acestuia, crește respingerea între resturile fosfoesterice ale membranelor și compus, deci difuziunea e îngreunată. Numărul de donori (HBD Hydrogen Bond Donors)/acceptori (HBA Hydrogen Bonds Acceptors) de legături de hidrogen e un alt parametru ușor calculabil, deoarece în calitate de donori și acceptori de legături de hidrogen servesc doar atomii de (N,O și F) ,dintre care azotul și oxigenul reprezintă macroelemente. Numărul mare de atomi donori/ acceptori de legături de hidrogen poate influența semnificativ absorbția compusului, deoarece formarea legăturilor de hidrogen între apă și compus generează un complex hidratat, cu masă mai mare și o creștere în volum, dar și cu un logP mai mic. De asemenea, poate duce la interacțiuni cu diverse alte molecule.

Numărul de legături rotabile (LR) este un parametru care indică ordinul numărului de conformații tridimensionale posibile, pe care le poate lua compusul. Acest parametru se calculează strict în funcție de structura inserată în program, prin cuantificare. Totuși, exactitatea acestui parametru ar putea fi discutabilă, deoarece anumite substanțe prezintă tautomeri (de exemplu amidă ↔ iminol) care diferă prin numărul de legături simple și duble. De asemenea, anumite structuri prezintă legături simple, imobilizate steric, ceea ce ar duce la o predicție greșită în cazul considerării echivalenței rotabil = simplu.

Aria suprafeței polare (TPSA - Total Polar Surface Aria) este de asemenea un parametru important, deoarece membrana celulară este

preponderent hidrofobă (polară la exterior și nepolară în interior, resturile acizilor grași fiind mai lungi decât blocurile polare ale esterului fosforic). Hidrofobicitatea membranei asigură deci o difuzie mai simplă a substanțelor neutre electric sau slab încărcate.

Sarcina netă a compusului reprezintă sarcina acestuia la pH fiziologic, care are valoarea de cca. 7.4. Calcularea acestui parametru are la bază valorile pKa ale grupărilor funcționale din moleculă, și valoarea optimă a acestuia este un număr întreg, în intervalul [-1;1].

Reguli și filtre

Definirea unei reguli pentru predicția BD *in silico* are la bază procesarea unei baze de date a compușilor cunoscuți, în funcție de anumiți parametri studiați. Ulterior, sunt selectate limitele de interval, între care biodisponibilitatea atinge valori considerabile. (Oashi T., Ringer A.L. et al. 2011). Ilustrarea analizei grafice este redată în FIG. 1.

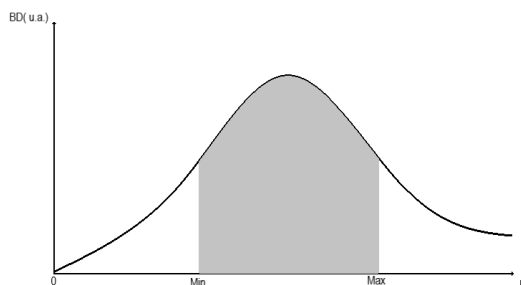


FIG. 1. Distribuția Gaussiană a compușilor biodisponibili în funcție de un parametru arbitrar P, care poate lua valori continue. Abrevierile în grafic desemnează: BD (u.a.) - Compuși biodisponibili, unități arbitrare; Min- Valoarea luată drept minim de interval; Max- Valoarea luată drept maxim de interval. Aria colorată de sub graphic, mărginită de ordonatele Min și Max reprezintă totalitatea compușilor care se încadrează în regulă după valoarea lui P.

Figura 1 arată totodată că predicțiile *in silico* sunt generalizatoare, funcționând în baza unui model statistic și nu a interacțiunii reale preparat → sistem de absorbție → organism. Interavalele exterioare acestui interval prezintă compuși biodisponibili, în număr mai mic, însă cu potențial medicamentos.

Pionerul predicției *in silico* este considerat Lipinski care a examinat substanțele administrate oral pentru a defini intervalele proprietăților fizico-chimice pentru o mai mare probabilitate de absorbție (Lipinski C. A. et al. 2001). Ulterior au fost elaborate și alte filtre, pentru a prioritiza cercetarea *in vitro* și *in vivo* a medicamentelor prezise computațional.

În Tabelul 1 sunt prezentate criteriile de selecție a biodisponibilității orale pentru medicamente potențiale (drug-like compounds) în conformitate cu mai multe filtre. Informațiile despre acestea au fost preluate din programul SwissADME, destinat predicției proprietăților fizico-chimice și ale parametrilor ADME (Daina et al., 2017). Din Tabelul 1 pot fi deduse următoarele:

1. Parametrii MW, LogP și TPSA sunt cei mai relevanți, fiind luați în considerare de majoritatea regulilor.
2. Regula Muegge este cea mai concretă, fiind totodată și o sumarizare a regulilor Lipinski (excluzând moleculele foarte usoare), Veber, și într-o anumită măsură a regulilor Ghose și Egan.

TABEL 1. Criteriile utilizate de programul SwissADME pentru filtrele care prezic biodisponibilitatea orală. Abrevierile semnifică: MM - Masa moleculară, HBA(Hydrogen Bond Acceptor) - Acceptori de legături de hidrogen, HBD (Hydrogen Bond Donor) - Donor de legătură de hidrogen, TPSA (Total Polar Surface Area) - Aria topologică totală a suprafeței, RM - Refracția Molară, Nr.A- Numărul de atomi, LR- Legături rotabile, Nr.C- Numărul atomilor de carbon.

Criterii	Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge
MM, Da	≤ 500	160-480	-	-	200-600
LogP*	(M) ≤ 4,15	(W) [-0,4; 5,6]	-	(W) ≤ 5,88	(X) [-2; 5]
HBA**	≤ 10	-	-	-	≤ 10
HBD**	≤ 5	-	-	-	≤ 5
TPSA	-	-	≤ 140	≤ 131,6	≤ 150
RM	-	[40; 130]	-	-	-
Nr.A	-	[20; 70]	-	-	-
LR	-	-	≤ 10	-	≤ 15
Heteroatomi	-	-	-	-	≥ 1
Cicluri	-	-	-	-	≤ 7
Nr.C	-	-	-	-	≥ 4

*LogP poate fi calculat după mai mulți algoritmi, respectiv fiecare filtru ia în considerare MlogP, WlogP, XlogP sau logP

**În cazul regulii lui Lipinski, HBA semnifică atomi de N sau O, iar HBD grupări OH și NH

O altă formulare empirică a fost dată de (Hann et al. 2004), pentru compușii țintă (lead-like compounds): $MW \leq 460$, $-4 \leq \log P(o/w) \leq 4.2$, $\log SW \geq -5$, $LR \leq 10$, $Cicluri \leq 4$, $HBD \leq 5$, și $HBA \leq 9$. Parametrul nou (logSW) caracterizează solubilitatea intrinsecă a compusului în apă și este important în cazul compușilor hidrofobi, foarte puțin solubili.

O problemă esențială a folosirii regulilor de disponibilitate (în modul în care sunt formulate mai sus) este analiza unitară a fiecărui parametru, fără a lua în calcul interacțiunea dintre aceștia. Pe de altă parte, elaborarea unor reguli mai complicate necesită înțelegerea detaliată a proceselor de absorbție, a transportului intramembranar etc (Oashi et al. 2011).

Factori adiționali. În foarte multe cazuri, predicția biodisponibilității este complicată de particularitățile structurii chimice ale compusului, care

generează interacțiuni intra- și intermoleculare aparte, care sunt complicat de anticipat în formularea regulilor de filtrare (Oashi et al. 2011).

Cele mai simple exemple ar fi situațiile în care compusul conține grupări donor și acceptor de legături de hidrogen la distanță de 4-6 atomi, adică există posibilitatea formării ciclurilor intramoleculare stabile de 5-7 atomi. Procesul de formare a unei legături intramoleculare de hidrogen este exergonic, respectiv compusul poate să-și modifice structura tridimensională. Pe de altă parte, formarea unor așa legături minimizează interacțiunile dipolare între HBD și HBA cu apa, acestea blocându-se reciproc. Astfel poate fi mărită permeabilitatea compusului față de membrana fosfolipidică (Alex et al. 2011). O ilustrare a acestui proces este redată în FIG. 2.

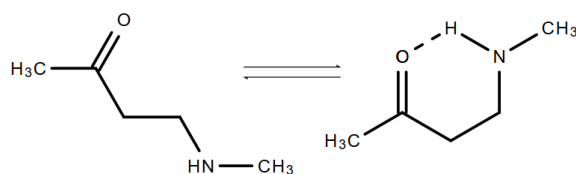


FIG. 2. Formarea intramoleculară a legăturii de hidrogen într-un compus în care Donorul legăturii de hidrogen (gruparea –NH–) și Acceptorul legăturii de hidrogen (gruparea =O) pot forma cicluri stabile (de 5-7 atomi). Formarea acestei legături exclude minim 2 molecule de apă de hidratare, deoarece este blocată o pereche de electroni ai atomului de oxigen și atomul de hidrogen aminic. În cazul în care dG_{aq}^0 pentru această reacție e negativă, compusul cu un astfel de segment structural se va găsi în soluție preponderent în forma din dreapta.

TABEL 2. Diferența predicțiilor furnizate de programul SwissADME pentru parametri fizico-chimici ai tautomerilor capsaicinei.

Tautomer	LR	HBA	HBD	RM	TPSA(Å²)	Consensus LogP
Caps.amidă	10	3	2	90,52	58,56	3,43
Caps.iminol	9	4	2	92,78	62,05	4,02

Un alt exemplu ar putea fi cazul tautomeriei, cum ar fi cel între structurile amidă- iminol. În Tabelul 2 sunt prezentați parametri fizico-chimici pentru 2 structuri tautometrice ale capsaicinei, un alcaloid din ardeii iute, preziși cu ajutorul programului SwissADME.

O diferență majoră se observă în cazul LogP pentru cei 2 tautomeri, forma iminol fiind de cca 3,89 ($10^{\text{LogP}(\text{iminol}) - \text{LogP}(\text{amidă})}$) ori mai hidrofobă decât forma amidică. Prin urmare, parametri fizico-chimici ai moleculei respective

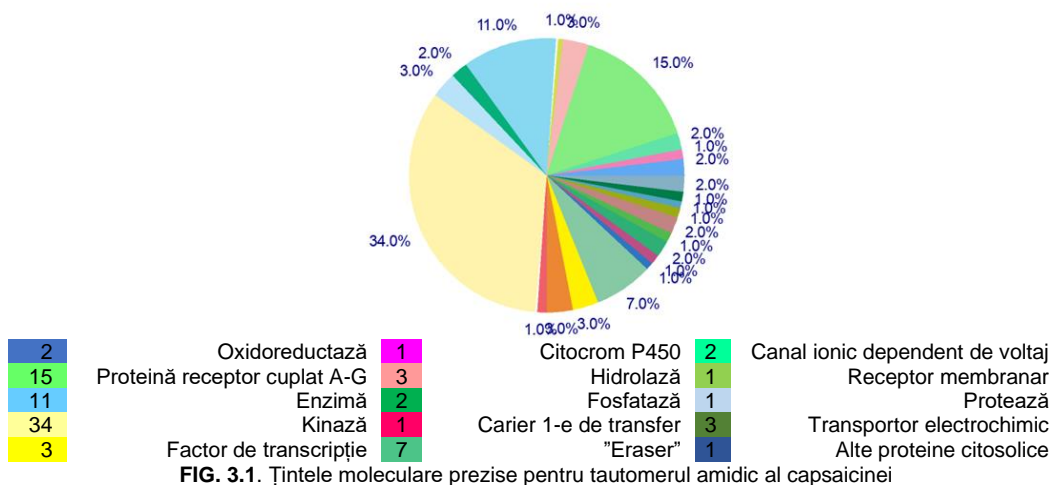
reprezintă în realitate o medie ponderată a valorilor fiecărei forme, în coordonanță cu concentrația acestora la echilibru în organism.

Pentru o descriere calitativă mai bună a diferenței structurale tautometrice, am comparat diferențele în țintele moleculare prezise pentru cei doi tautomeri ai capsaicinei, cu ajutorul programului SwissTargetPrediction (Daina et al, 2019). Deși țintele moleculare nu influențează direct biodisponibilitatea, diferențele în repartiția acestora sunt direct corelate cu structura chimică, respectiv tridimensională, care la rândul său determină diferențe în absorbția și distribuția compusului.

Datele de intrare pentru SwissTargetPrediction sunt formulele SMILES ale celor 2 enantiomeri sau formulele lor structurale, rezultatele fiind probabilitățile de interacțiune cu diverse proteine umane (Daina et al, 2019).

FIG. 3.1. și TABELUL 3.1. prezintă țintele moleculare ale capsaicinei amidice. Informații detaliate cu privire la țintele acestui izomer sunt disponibile accesând: http://www.swisstargetprediction.ch/result.php?job=2145561369&organism=Homo_sapiens

FIG. 3.2. și TABELUL 3.2. prezintă țintele moleculare ale capsaicinei iminolice. Informații detaliate cu privire la țintele acestui izomer sunt disponibile accesând : http://www.swisstargetprediction.ch/result.php?job=964524555&organism=Homo_sapiens



Figurile 3.1. și 3.2. arată diferența în distribuția țintelor moleculare pentru cei 2 tautomeri. Această distribuție poate fi explicată prin interacțiunea potențialelor ținte cu molecula întregă, și nu doar cu segmentul amido-iminolic. Astfel, se realizează o interacțiune complexă a grupării amidă-iminol cu inelul aromatic al capsaicinei, legătura dublă, atomii de oxigen legați de

inelul aromatic etc., structura având minim 2 structuri de rezonanță, câte una pentru fiecare tautomer.

Notabilă e potența tautomerului amidic de a reacționa cu multiple ținte, în contrast cu tautomerul iminolic, mai puțin reactiv. Totodată, amida prezintă o probabilitate prezisă egală cu 1 pentru 3 ținte moleculare, iminolul având probabilități mici sau nule. Capacitatea de a interacționa cu diverse proteine ar putea avea impact asupra distribuției compusului în organism, datorită interacțiunii cu proteinele sanguine.

TABEL 3.1. Probabilitățile de interacțiune ale tautomerului amidic al capsaicinei cu unele proteine umane.

Ținta moleculară	Clasa țintei	Probabilitatea
Ciclooxigenază-1	Oxidoreductază	
Citocrom P450 1A2	Citocrom P450	
Receptor vaniloid	Canal de ioni dependent de voltaj	
Receptor cannabinoid 1	Proteină receptor cuplată A-G	
Receptor cannabinoid 2	Proteină receptor cuplată A-G	
Butirilcolinesterază	Hidrolază	
Acetilcolinesterază	Hidrolază	
Receptor opioid sigma	Receptor membranar	
Anandamid- amidohidrolază	Enzimă	
Acyl-CoA desaturază	Enzimă	
Receptor dopaminic D2	Proteină receptor cuplată A-G	
1B protein-tirozin fosfatază	Fosfatază	
Proteină morfogenică osoasă 1	Protează	
Kinază cyclic dependentă 5	Kinază	

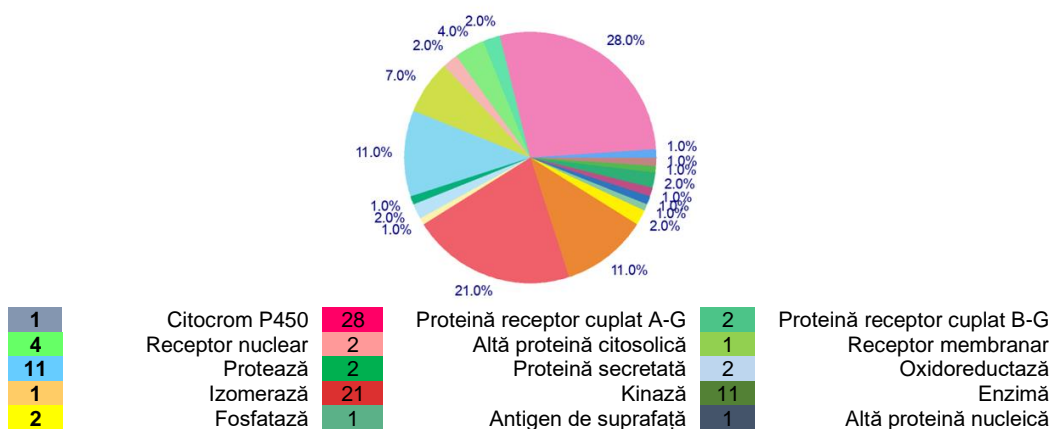


FIG. 3.2. Țintele moleculare prezise pentru tautomerul iminolic al capsaicinei

BAERLE: : An overview of bioavailability in silico prediction

TABEL 3.2. Probabilitățile de interacțiune ale tautomerului iminolic al capsaicinei cu proteine umane.

Proteina țintă	Clasa țintei	Probabilitatea
Tromboxan-A sintază	Citocrom P450	
Receptor al factorilor activatoare de trombocite	Proteină receptor cuplată A-G	
Receptor de 1-sfingozinfosfat Edg-5	Proteină receptor cuplată A-G	
Receptor glucagonic	Proteină receptor cuplată B-G	
Receptor glucocorticoid	Receptor nuclear	
Proteină activatoare de 5-lipooxigenază	Altă proteină citosolică	
Receptor TRAIL 1	Receptor membranar	
Beta-secretază 1	Protează	
Inhibitor-1 de activator plasminogenic	Proteină secretată	

CONCLUZII

Metodele de predicție in silico a biodisponibilității au ca avantaje timpul redus de procesare, economia resurselor financiare și umane, fiind extrem de utile în cercetarea potențialelor medicamente. Totuși, acestea pot prezenta dezavantaje față de experimentul real, descriind cu o exactitate variabilă caracteristicile compușilor biologic activi. În consecință, utilizarea lor trebuie coordonată cu verificarea empirică a rezultatelor, iar perfecționarea algoritmilor trebuie efectuată permanent, pentru apropierea predicțiilor acestora de rezultatele reale.

Mulțumiri

Mulțumesc D-nei Prof. Dr. Adriana Isvoran, Facultatea de Chimie, Biologie, Geografie, Universitatea de Vest din Timișoara, pentru corectări și sfaturi utile, precum și pentru sugestiile de formulare și redactare.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- Alex A., Millan D.S., Perez M., Wakenhut F., Whitlock G.A. 2011. Intramolecular hydrogen bonding to improve membrane permeability and absorption in beyond rule of five chemical space; *Med. Chem. Commun* DOI: 10.1039/c1md00093d
- Daina A., Michielin O., Zoete V. 02 July 2019. *Nucleic Acids Research*, Volume 47, Issue W1, W357–W364, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz382>
- Daina A., Michielin O., Zoete V. 03 Mar 2017. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep.* 2017;7:42717. doi:10.1038/srep42717
- Hann M.M., Oprea T.I. 2004. Pursuing the leadlikeness concept in pharmaceutical research. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8:255–263.
- Hebert, Mary F. 2013. *Impact of Pregnancy on Maternal Pharmacokinetics of Medications. Clinical Pharmacology During Pregnancy.* Elsevier. pp. 17–39. doi:10.1016/b978-0-12-386007-1.00003-9. ISBN 978-0-12-386007-1.
- Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W. & Feeney P. J. 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 46, 3–26.
- Oashi T., Ringer A.L., Raman E.P., Mackerell A.D. 2011. Automated selection of compounds with physicochemical properties to maximize bioavailability and drug likeness. *J Chem Inf Model.* 51(1):148-158. doi:10.1021/ci100359a.