

Fyzikálně-chemické vlastnosti látek

MBDD 22.2.2018

ADME :

Absorpce – **D**istribuce – **M**etabolismus –
Exckrece

Screening ADME vlastností je stejně důležité
jako screening biologické aktivity látek.

Velké farmaceutické firmy jsou schopny za rok otestovat více než **3 000 000** nových molekul na biologickou aktivitu.

Přibližně **30 000** prokáže dobrou aktivitu.

Většina z nich, jakkoliv jsou účinné, nemá potřebné vlastnosti z hlediska fyzikálního, metabolického nebo toxikologického.

Přibližně **30** z nich projde do fáze klinického hodnocení.

0 - 3 z nich jsou pak uvedeny na trh jako léčiva.

Přibližně 30% farmakologických testování je zastaveno kvůli problémům s ADME.

„A“ z ADME (Absorpce)

vlastnosti ovlivňující absorpci:

acido-basický charakter

lipofilita

rozpustnost

membránová permeabilita

Transportní model:

permeabilita – rozpustnost - ionizace –
pH-rozdělovací hypotéza

Pasivní difuze: důsledek difuzivity a
koncentračního gradientu

Ionizovatelné molekuly musí být při permeaci v
neionizovaném stavu.

Množství neionizované formy je závislé na pH.

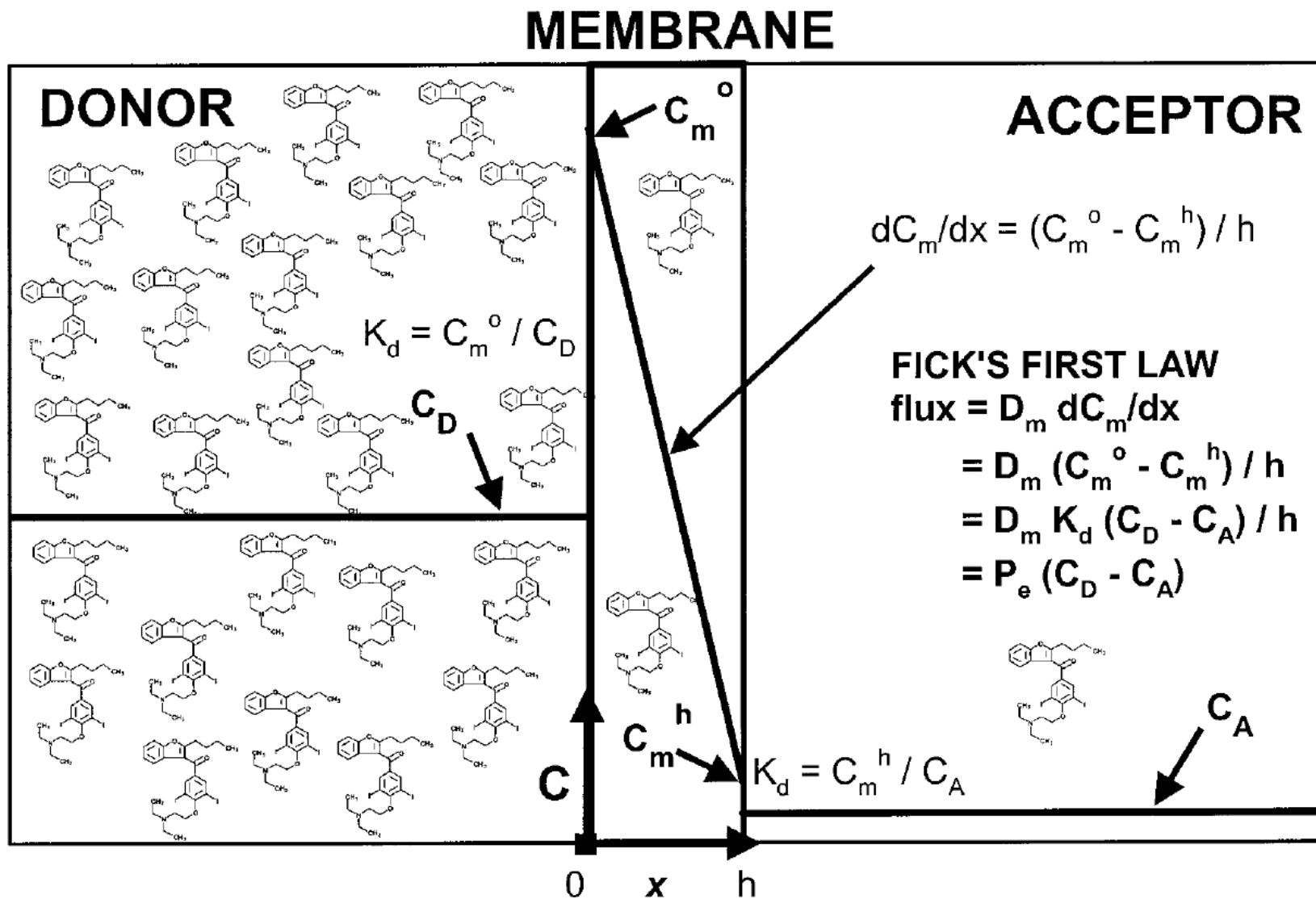


Figure 2.1 Transport model diagram, depicting two aqueous cells separated by a membrane barrier. The drug molecules are introduced in the donor cell. The concentration gradient in the membrane drives the molecules in the direction of the acceptor compartment. The apparent partition coefficient, $K_d = 2$. [Avdeef, A., *Curr. Topics Med. Chem.*, **1**, 277–351 (2001). Reproduced with permission from Bentham Science Publishers, Ltd.]

C_m^0, C_m^h : koncentrace neionizované formy v membráně (těžko se dá stanovit)

h : tloušťka membrány

$\log K$: rozdělovací koeficient lipidy/voda

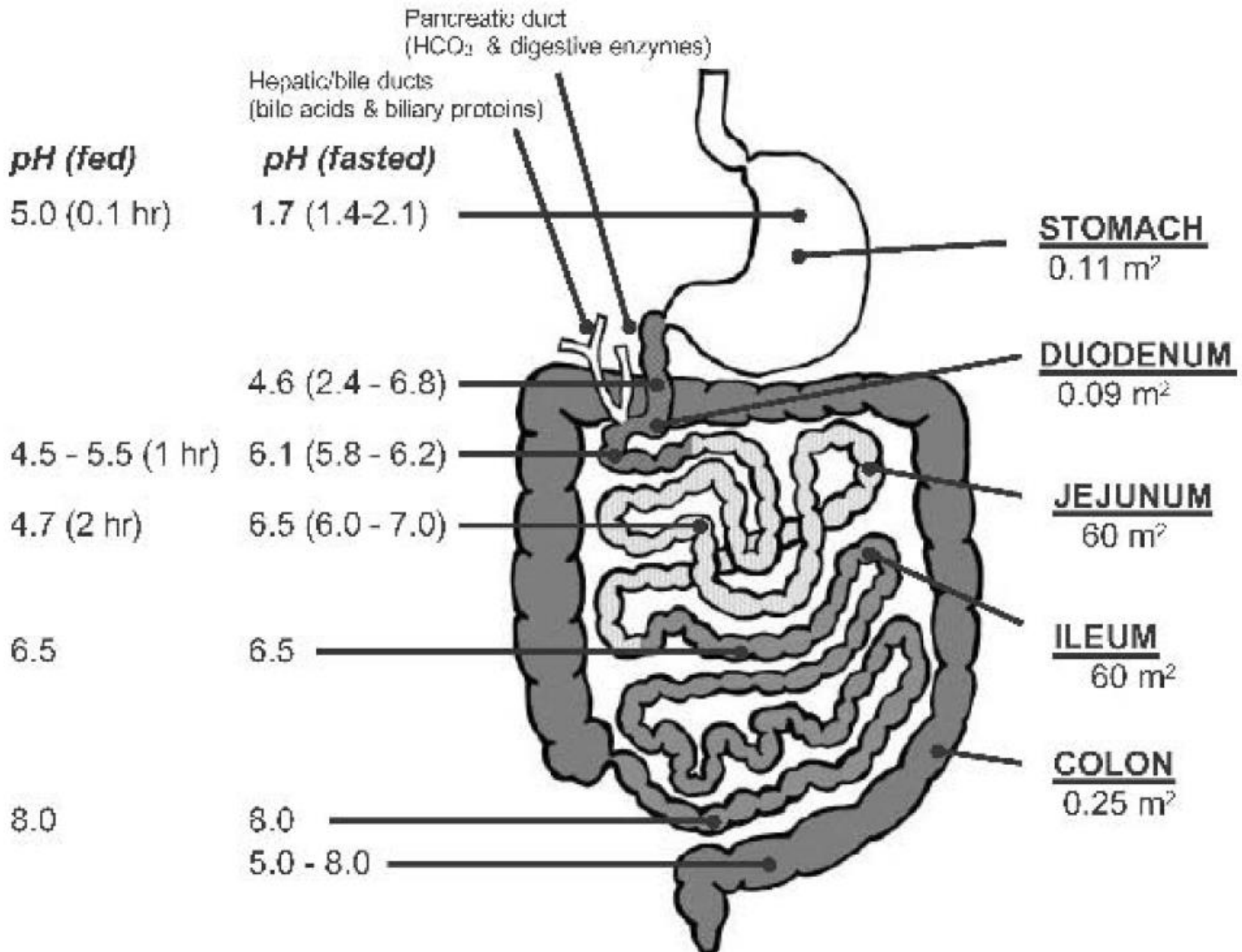
C_D, C_A : koncentrace neionizované formy ve vodě (jednoduše se stanoví pomocí HPLC)

D_m : difuzivita

P_m : permeabilita

$$P_m = \frac{D_m K_d}{h}$$

Fyziologické vlastnosti GIT



Jejunum + ileum > 99% povrchu absorpce

Čas potřebný pro průchod:

Prázdný žaludek: vodný roztok 5 - 20 min

pevná strava 0,5 - 3 hod

tučná strava až 13 hod

Jejunum + ileum : 3 - 5 hod

Kolon: 7 - 20 hod (záleží na čase spánku)

*pokles pH v kolonu může být způsoben krátkými
mastnými kyselinami produkoványými střevní
mikroflórou*

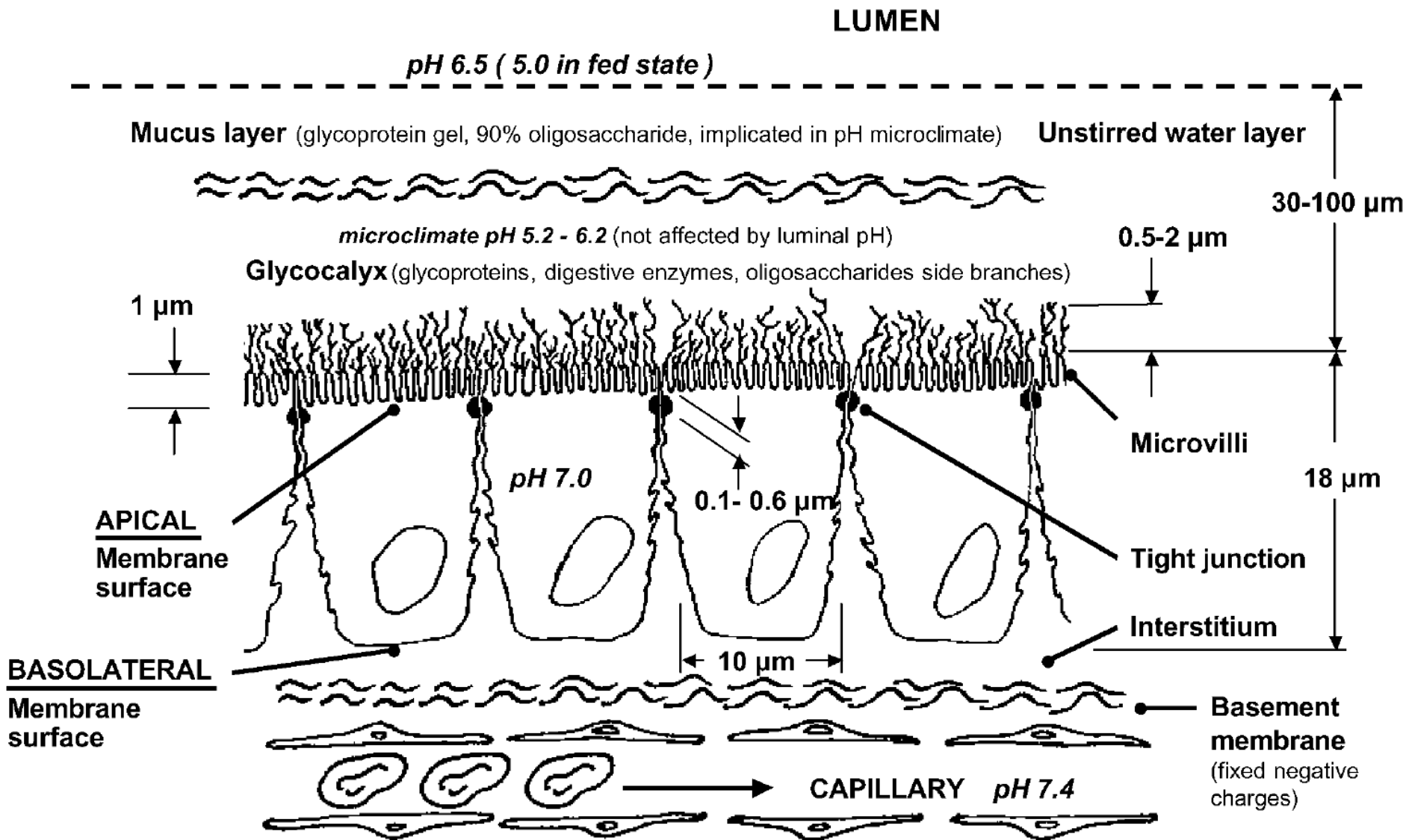


Figure 2.5 Schematic of the structure of epithelial cells, based on several literature sources [55,63,69,73,74,76,78,79]. The tight junctions and the basement membrane appear to be slightly ion-selective (lined with some negatively charged groups) [75,76,79]. [Avdeef, A., *Curr. Topics Med. Chem.*, **1**, 277–351 (2001). Reproduced with permission from Bentham Science Publishers, Ltd.]

- glycocalyx zpomaluje absorpci lipofilních molekul
- zonula occludens (tight junction) umožňuje volný průchod malým molekulám (< 200 Da)
- pozitivně nabitě molekuly mají lepší permeabilitu přes bazální membránu
- kyselé pH mikroklíma v mukózní vrstvě usnadňuje permeaci slabých kyselin

pH nitrobuněčných struktur:

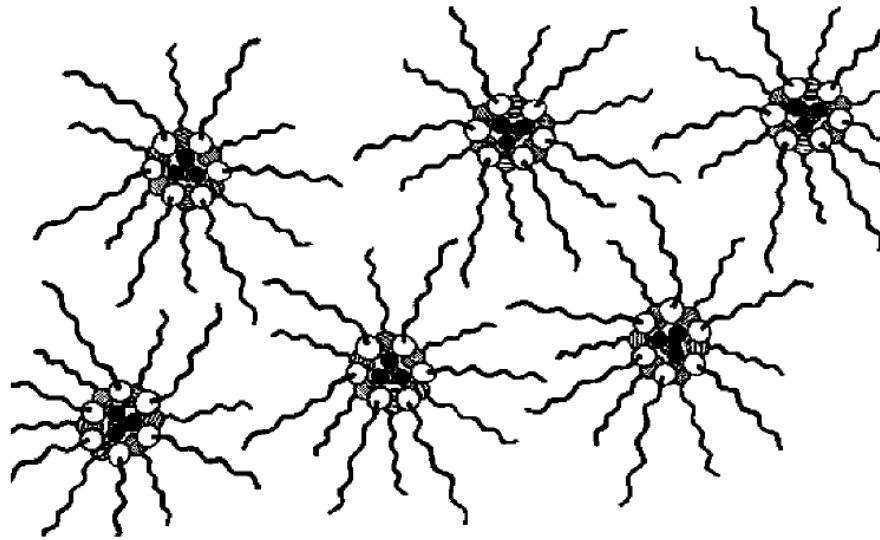
TABLE 2.1 Intracellular pH Environment

Intracellular Compartment	pH
Mitochondria	8.0
Cytosol	7.2–7.4
Endoplasmic reticulum	7.1–7.2
Golgi	6.2–7.0
Endosomes	5.5–6.0
Secretory granules	5.0–6.0
Lysosomes	4.5–5.0

Structura oktanolu.

Oktanol slouží dlouhá léta jako model membrány

Oktanol nasycený vodou:



klastry oktanol-voda umožňují vstup i hydrofilních látek, dokonce i malému množství látek ionizovaných

Klasifikační systém biofarmaceutik (BCS)

Čtyři třídy BCS podle rozpustnosti a permeability

Pro klasifikaci platí:

Rozpustnost je množství vody potřebné k rozpuštění nejvyšší jednotlivou dávkou při takovém pH v rozmezí (1-8), při kterém je rozpustnost látky nejhorší:

nízká $s > 250$ ml $>$ vysoká s

Permeabilita je stanovována v lidském jejunu *in vivo*

vysoká $> 10^{-4}$ $>$ nízká

Biopharmaceutics classification system (BCS)

		HIGH SOLUBILITY	LOW SOLUBILITY
HIGH PERMEABILITY	<p>CLASS 1 (amphiphilic) ^a diltiazem antipyrine labetolol glucose captopril L-dopa enalapril metoprolol propranolol phenylalanine</p> <p>1</p>	<p>CLASS 2 (lipophilic) ^b flurbiprofen ketoprofen naproxen desipramine diclofenac itraconazole piroxicam carbamazepine phenytoin verapamil</p> <p>2</p>	
LOW PERMEABILITY	<p>CLASS 3 (hydrophilic) ^c famotidine atenolol cimetidine acyclovir ranitidine nadolol hydrochlorothiazide</p> <p>3</p>	<p>CLASS 4 ^d terfenadine furosemide cyclosporine</p> <p>4</p>	

pH 1-8

^a RATE OF DISSOLUTION limits *in vivo* absorption

^b SOLUBILITY limits absorption flux

^c PERMEABILITY is rate determining

^d No IVIV (*in vitro* - *in vivo*) correlation expected

Ionizace

Slabé kyseliny a zásady se v roztocích ionizují pouze z části v závislosti na pH prostředí.

pH prostředí tedy určuje množství neionizované formy potřebné pro absorpci.

Termodynamickým parametrem tohoto procesu je disociační konstanta K_A (pK_A).

Znalost pK_A látky je velice důležitá – pomůže předvídat chování látky v procesech absorpce, distribuce i exkrece.

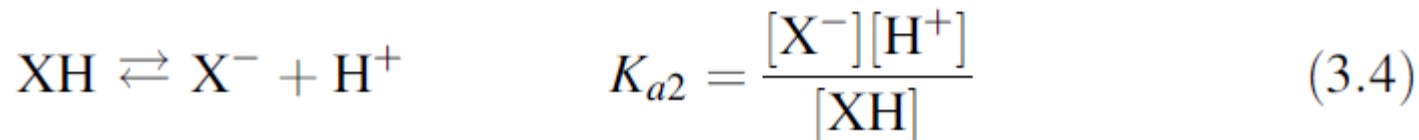
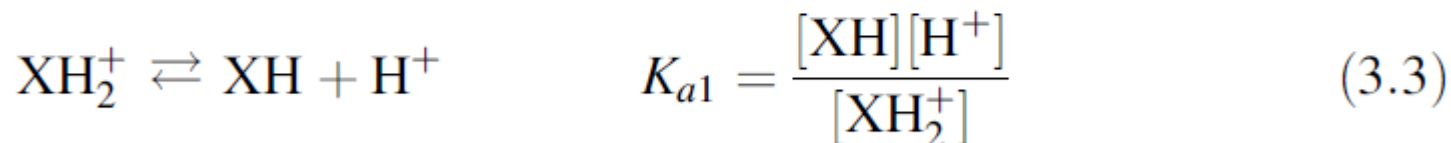
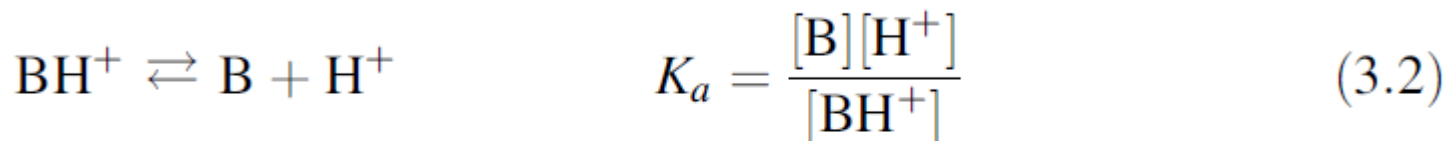
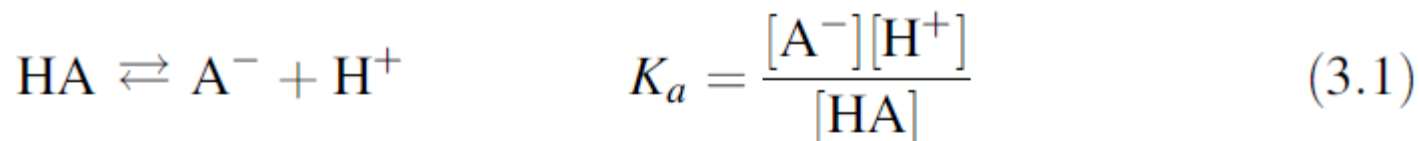
Ionizace Příklad

pH moče (normálně 5,7-5,8) může být jednoduše změněno perorálním podáním NH_4Cl nebo NaHCO_3 k usnadnění exkrece ionizovatelných látek v případě intoxikace.

Slabé kyseliny jsou extrahovány do zásadité moče, slabé zásady do kyselé moče.

Henderson-Hasselbachova rovnice

termodynamické rovnováhy pro slabé kyseliny, baze a diprotický amfolyt:



negativním zlogaritmováním získáme Henderson-Hasselbachovy rovnice:

Henderson-Hasselbachovy rovnice

$$pK_a = \text{pH} + \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]} \quad (3.5)$$

$$pK_a = \text{pH} + \log \frac{[\text{BH}^+]}{[\text{B}]} \quad (3.6)$$

$$pK_{a1} = \text{pH} + \log \frac{[\text{XH}_2^+]}{[\text{XH}]} \quad (3.7)$$

$$pK_{a2} = \text{pH} + \log \frac{[\text{XH}]}{[\text{X}^-]} \quad (3.8)$$

$\text{pH} = \text{pK}_A$: koncentrace ionizované a neionizované formy je stejná

$\text{pH} = \text{pK}_A - 2$: poměr (1:100) 99,9% neionizováno

$\text{pH} = \text{pK}_A + 2$: poměr (100:1) 99,9% ionizováno

Konstantní iontové prostředí pro stanovení

Iontová síla roztoku ovlivňuje míru disociace.

Stanovování pK_A musí proto probíhat ve standardizovaném prostředí:

0,15 M roztok KCl nebo NaCl jsou výhodné pro predikci chování v organismu (fyziologické podmínky)

Potentiometrické měření

Titrace vodného roztoku s přídavkem 0,15 M KCl
nebo NaCl

standardním roztokem HCl nebo KOH/NaOH

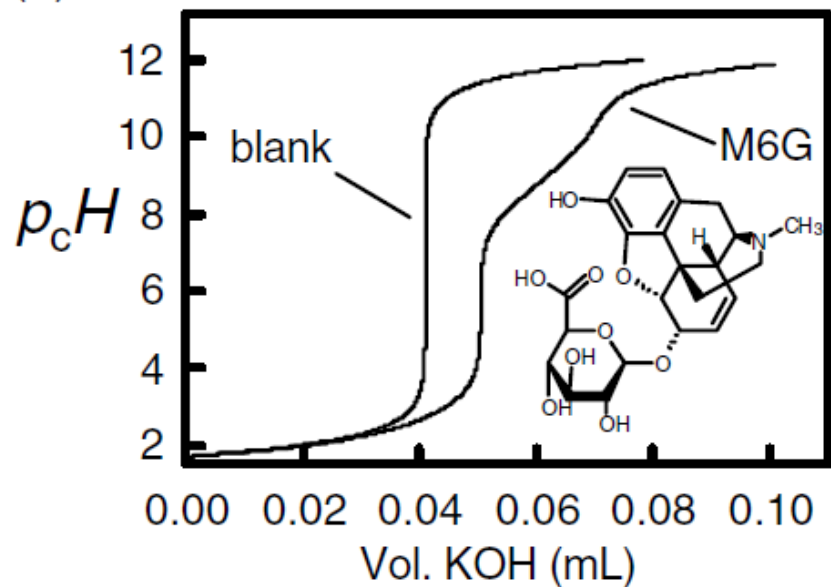
Je vytvořena potenciometrická titrační křivka.

V případě multiprotických látek může být ale
analýza titrační křivky zavádějící!

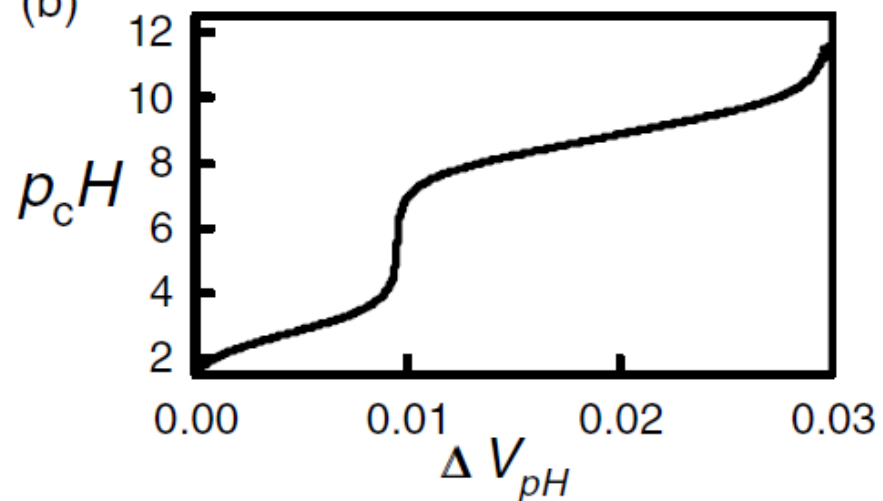
Musí být provedena Bjerrumova analýza:

Postup Bjerrumovy analýzy:

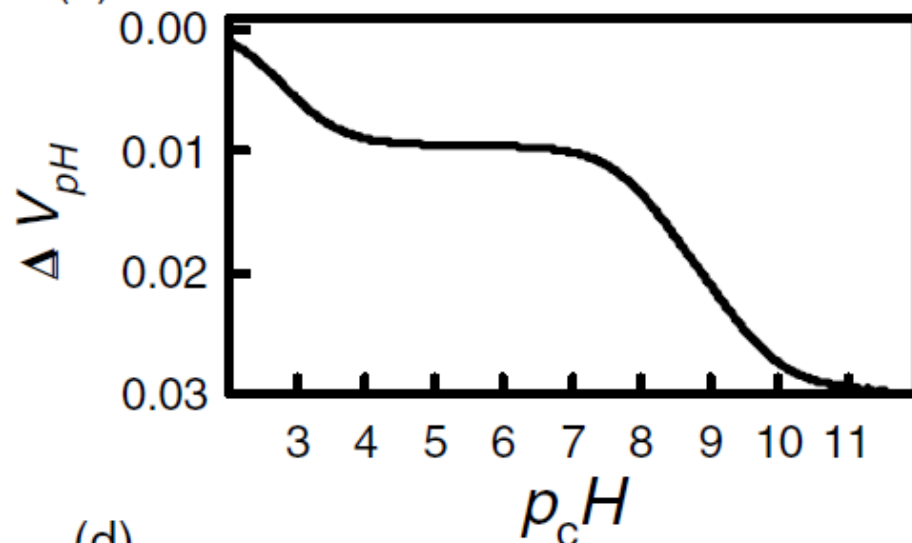
(a)



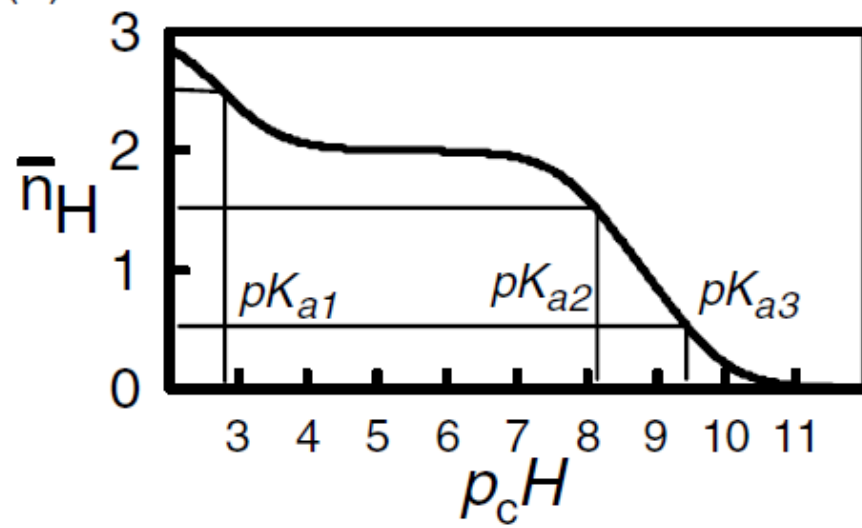
(b)



(c)



(d)



Postup Bjerrumovy analýzy:

1. Vytvoří se křivka vzniklá odečtením titrační křivky bez vzorku (blank) od titrační křivky se vzorkem (b)
2. obrátí se osy x za y (c)
3. Spotřeba se převede na poměr ionizovatelných vodíků (počet odvodíme od struktury):
Provede se diference mezi celkovým počtem ionizovatelných vodíků a aktuálně ionizovaných vodíků. Rovnovážný stav vždy mezi dvěma vodíky odpovídá příslušné hodnotě pK_A (d)

Problémy s rozpustností:

Mnoho biologicky aktivních látek je velmi špatně rozpustných ve vodě.

> 100 μM : žádné problémy při potenciometrii

10 – 100 μM : lze měřit pouze pokud je elektroda velmi pečlivě nakalibrována

< 10 μM : je nutno použít prostředí směsi rozpouštědel

Směsi organické rozpoštědlo-voda:

alkohol - voda (methanol, ethanol, propanol)

dimethylsulfoxid (DMSO) – voda

dioxan – voda

Naměřené hodnoty ve směsi můžeme
extrapolovat na hodnoty v samotné vodě pomocí
strukturně podobných standardů

Spectroscopická stanovení (UV-VIS):

nutný chromofor spojený s ionizovatelnými skupinami

vynesou se křivky závislosti molární absorpance na pH v širokém spektru vlnových délek
je potřeba najít vlnové délky při kterých se projeví změna absorpance nejvíce

pro každou látku je potřeba vyvinout specifickou metodu

Kapilární elektroforéza

mobilita ionizovatelných látek závisí na pK_A

sestrojí se křivky závislosti změřené mobility na pH

křivky mají sigmoideální tvar, hodnota pH v inflexním bodě odpovídá pK_A

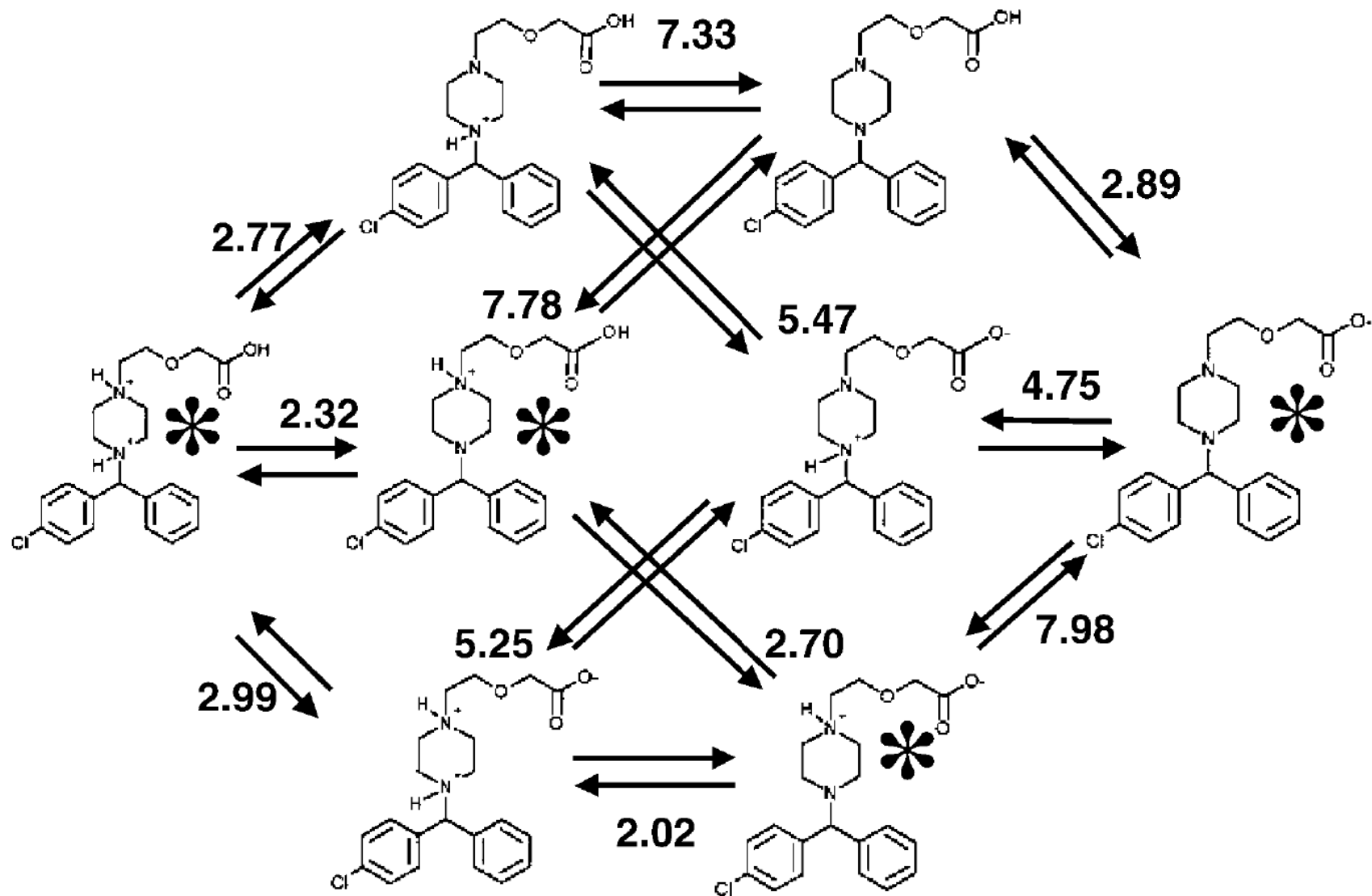
Makrokonstanty / mikrokonstanty

Některé multiprotické molekuly umožňují více tautomerních možností uspořádání struktury se stejným stupněm ionizace.

Změřené hodnoty pK_A jsou pak průměrné hodnoty několika hodnot dílčích procesů – jsou to makrokonstanty.

Mikrokonstanty mohou být stanoveny porovnáním mnoha sérií měření v různých směsích rozpouštědel (přídavkem kosolventu se posouvá každá pK_A o různou hodnotu) a UV-VIS detekcí změn chromoforů.

Makrokonstanty / mikrokonstanty (cetirizin)



Rozdělování do oktanolu

P – rozdělovací koeficient

D – skutečný rozdělovací koeficient (distribuční koeficient (závisí na pH)

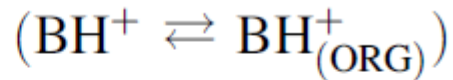
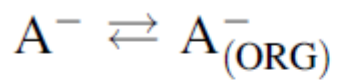


$$P_{\text{HA}} = \frac{[\text{HA}_{(\text{ORG})}]}{[\text{HA}]} \quad \left(P_{\text{B}} = \frac{[\text{B}_{(\text{ORG})}]}{[\text{B}]} \right)$$

látky, které se neionizují, mohou být jednoduše přímo stanoveny

Rozdělování do oktanolu

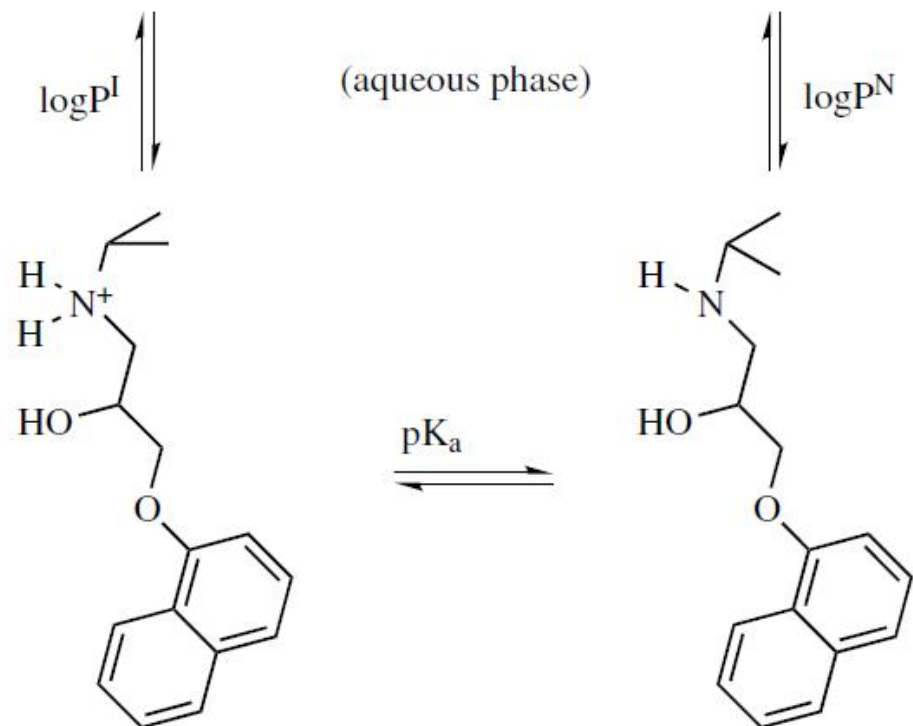
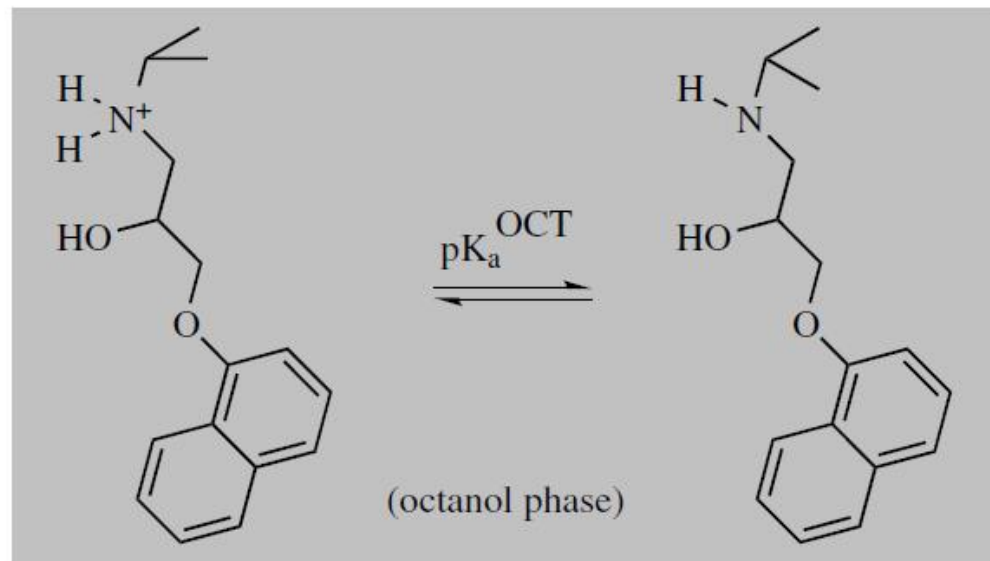
ionizovatelné molekuly se rozdělí také, avšak v mnohem menším měřítku:



$$P_A = \frac{[A_{(\text{ORG})}^-]}{[A^-]}$$

$$\left(P_{BH} = \frac{[BH_{(\text{ORG})}^+]}{[BH^+]} \right)$$

Rozdělování do oktanolu: Propranolol



Rozdělování do oktanolu

$$\text{diff}(\log P^{N-I}) = \log P^N - \log P^I = |\text{p}K_a^{\text{oct}} - \text{p}K_a|$$

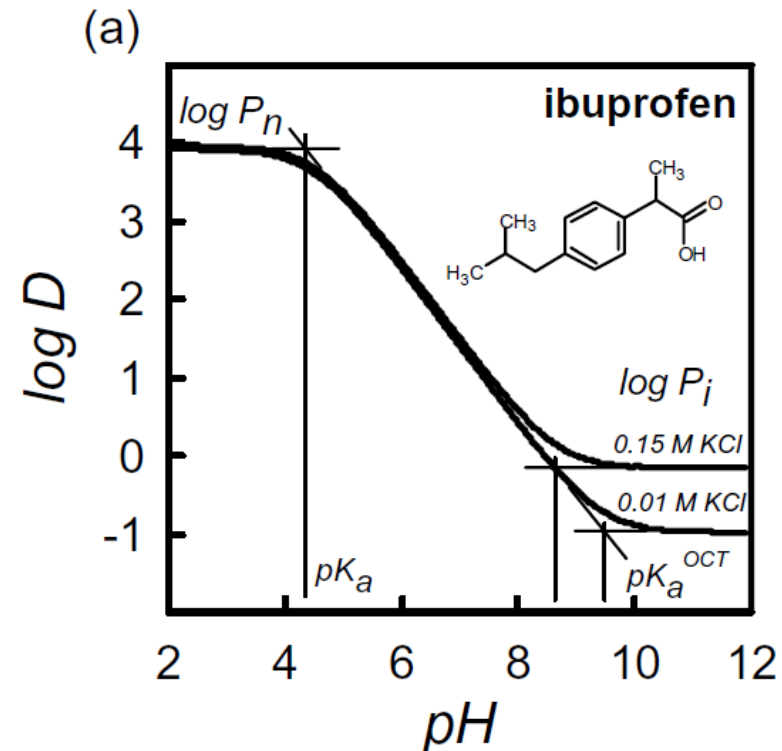
Rozdíly mezi ionizovanou a neionizovanou formou:
Rozdíl mezi jednotlivými rozdělovacími koeficienty
je roven rozdílu mezi jednotlivými $\text{p}K_A$

logD

Distribuční koeficient D se užívá pro ionizovatelné molekuly

$$D = \frac{([X_{(ORG)}]' + [XH_{(ORG)}]' + [XH_2_{(ORG)}]' + \dots)}{([X] + [XH] + [XH_2] + \dots)}$$

profily lipofility:



Vytřepávací metoda

koncentrace je stanovena ve vodné fázi (HPLC)

HPLC metody

retenční čas při použití hydrofobní kolony a vodného pufru jako mobilní fáze je úměrný lipofilitě

hodnoty $\log P$ mohou být vypočteny z retenčních časů s použitím standardů (strukturně podobných látek se známým $\log P$)

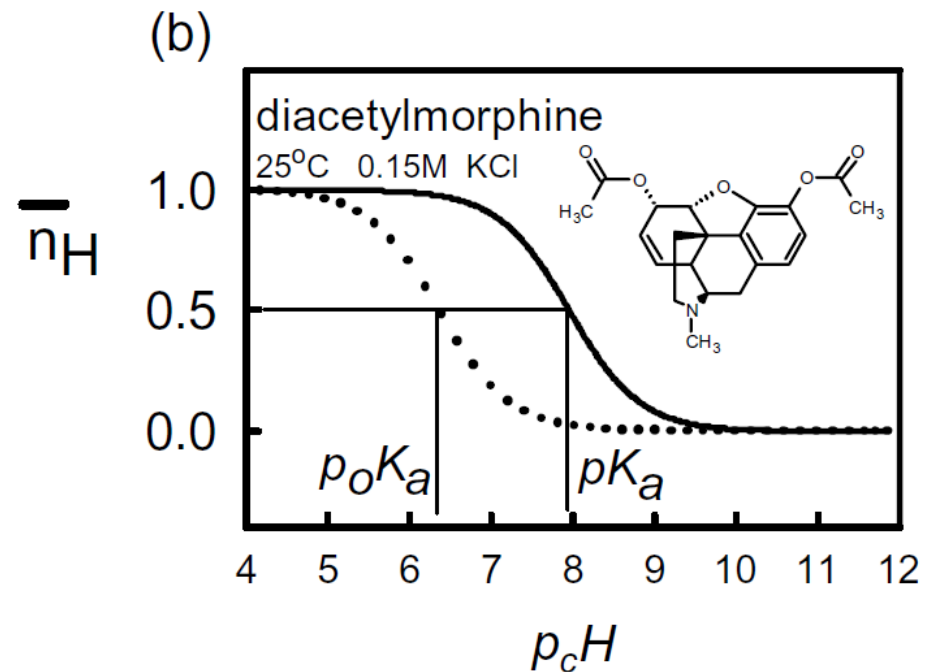
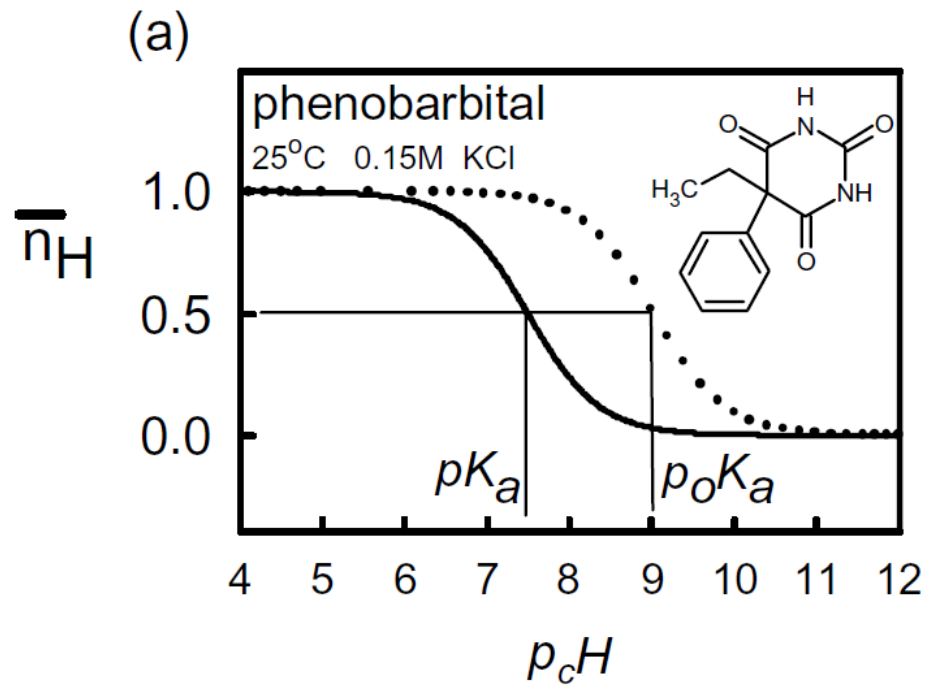
metoda založená na stanovení pK_A

titrace látky v obou fázích dohromady

Bjerrumova analýza je vytvořena pro potenciometrické křivky pro oktanol/vodu a samotnou vodu zvlášť

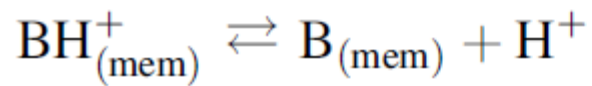
Rozdíl mezi pK_a ve vodě a změřenou pK_a ve směsi je rovna rozdělovacímu koeficientu

pH metrické stanovení hydrofilní / lipofilní látka



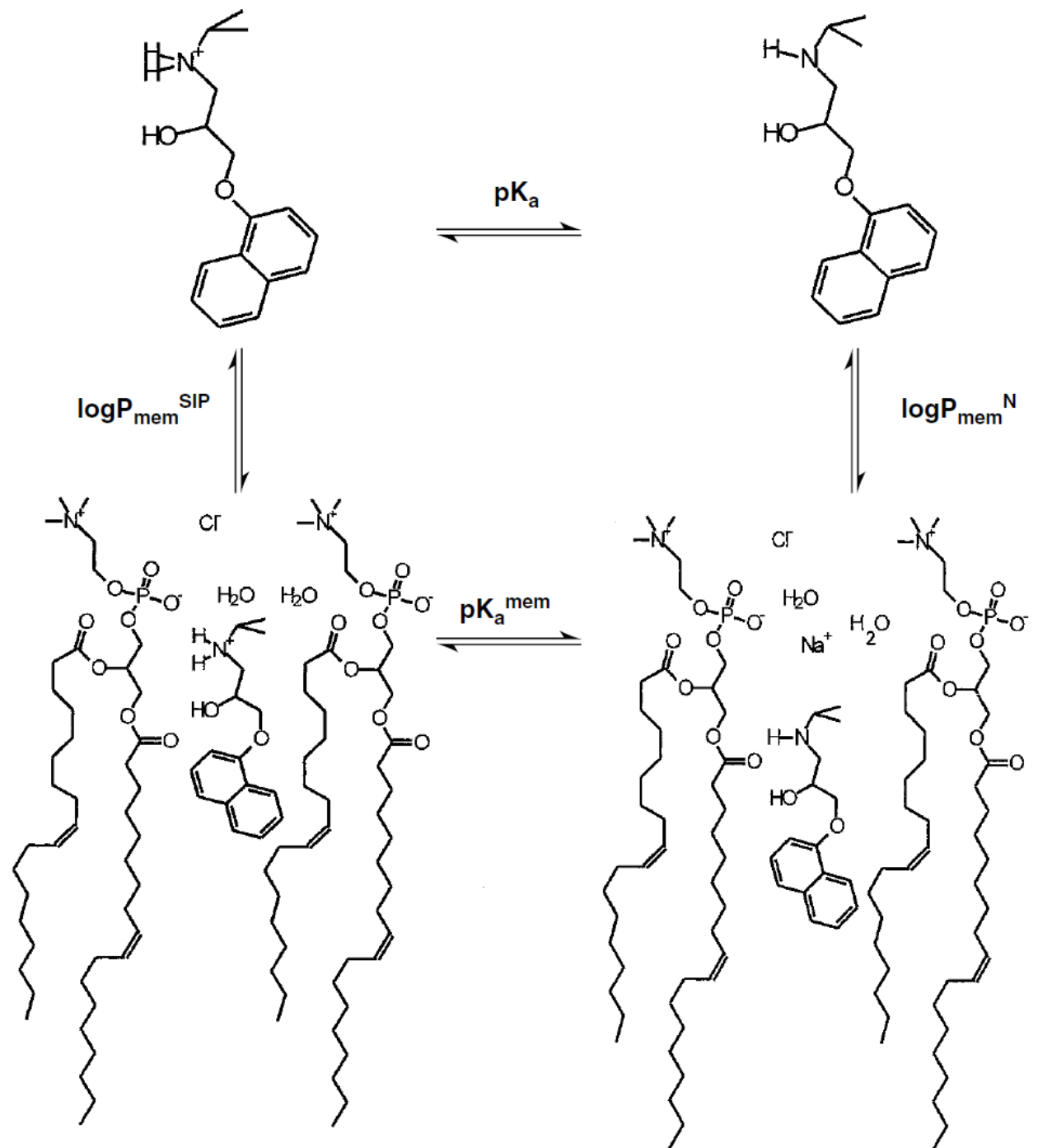
Rozdělování do liposomů

liposomy jsou podobnější skutečné membráně
rozdělení mezi membránu a vodné prostředí



$$K_a^{\text{mem}} = \frac{[\text{B}_{(\text{mem})}][\text{H}^+]}{[\text{BH}_{(\text{mem})}^+]}$$

Rozdělování do liposomů



Rozdělování do liposomů

Změny
dielektrických
vlastností
fosfolipidové
vrstvy

BULK WATER

78 (I=0)

75 (I=0.15M)

40-50

(positive electrostatics)

34 (I=0.03M)

29 (I=0.5M)

(negative electrostatics)

20-25

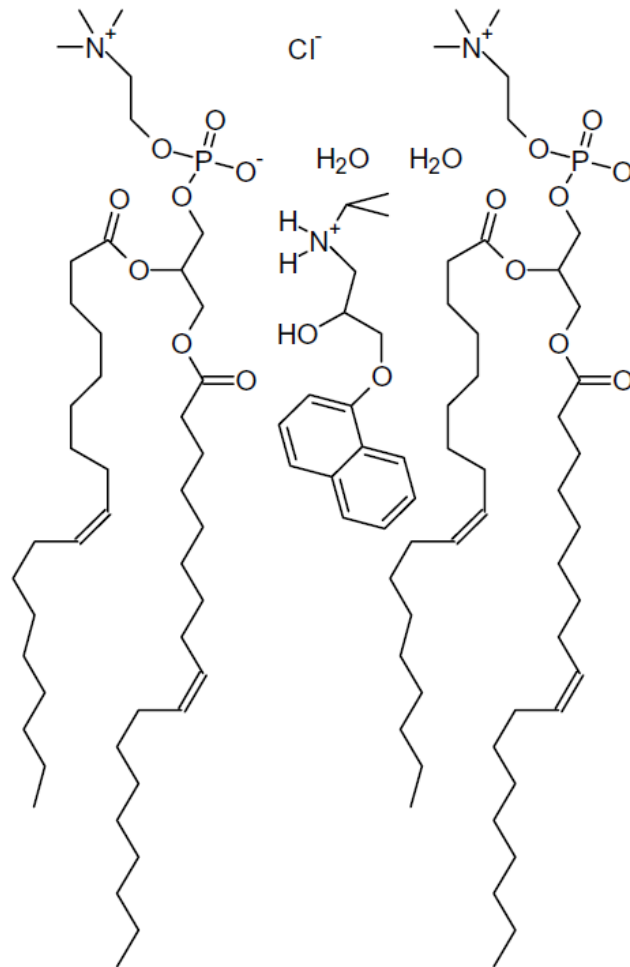
(carbonyl H-bond acceptors)

10

(cis double bonds)

2

(hydrocarbon core)



Rozdělování do liposomů

Liposomy jsou přidány do definovaného roztoku látky

po ustálení rovnováhy jsou liposomy odstraněny:
dialýzou
ultrafiltrací
centrifugací

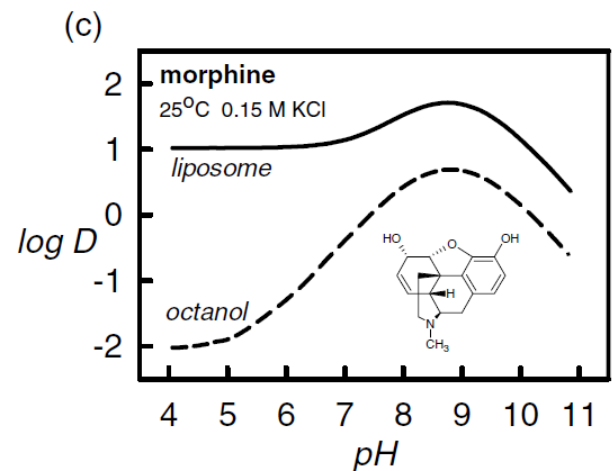
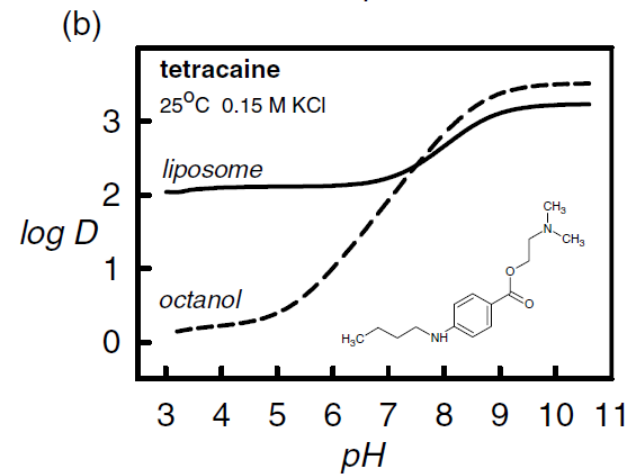
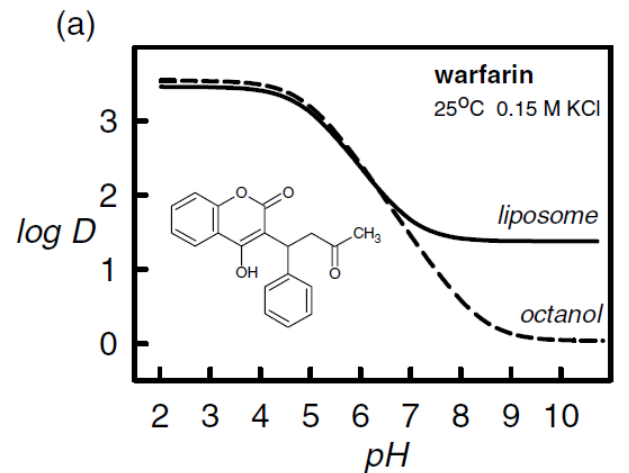
Množství, které zůstalo ve vodné fázi je stanoveno

Rozdělování do liposomů

rozdělování do liposomů může být také odvozeno od hodnot $\log P$ složitým matematickým procesem

Rozdělování do liposomů

složitá nelineární závislost



Rozpustnost

Rozpustnost ionizovatelných látek závisí na pKa monoprotické látky:

$$\begin{aligned} S &= [A^-] + [HA] && [\text{or } S = [B] + [BH^+]] \\ S &= \frac{[HA] K_a}{[H^+]} + [HA] && \left(\text{or } S = [B] + \frac{[B][H^+]}{K_a} \right) \\ &= [HA] \left(\frac{K_a}{[H^+]} + 1 \right) && \left(\text{or } = [B] \left\{ \frac{[H^+]}{K_a} + 1 \right\} \right) \\ &= S_0 (10^{-pK_a + pH} + 1) && \left(\text{or } = S_0 \{ 10^{+pK_a - pH} + 1 \} \right) \end{aligned}$$

diprotický amfolyt:

$$\begin{aligned} S &= [X^-] + [XH] + [XH_2^+] \\ S &= S_0 (1 + 10^{-pK_{a2} + pH} + 10^{+pK_{a1} - pH}) \end{aligned}$$

Rozpustnost

mnoho experimentálních problémů:

krystalická/amorfní forma

amorfie

polymorfismus

pevné solváty

krystalové kosolventy

tvorba agregátů v roztoku

tvorba micel u povrchově aktivních látek

Vytřepávací metoda

termostatovaný nasycený roztok je protřepáván mezi fázemi (pevná/roztok)

dlouhý čas ustavení rovnováhy (12h – 7 dní)

koncentrace ve vodní fázi je stanovena HPLC po mikrofiltraci a centrifugaci (oddělení pevné fáze)

Membránová permeabilita

V nejjednodušším modelu můžeme permeabilitu lineárně odvodit od rozdělovacího koeficientu membrána-voda

v praxi se často objevuje nelinearita:

- nepromíchaná vodní vrstva
- hydrofilní póry v membráně
- zadržení lipofilních látek uvnitř membrány
- mikrokrystalické srážení uvnitř membrány
- gradient pH uvnitř membrány
- vodíkové vazby, elektrostatické a hydrofobní interakce mezi látkou a složkami membrány
- náboj na povrchu membrány

Membránová permeabilita

další problémy *in vivo*:

- rozdílné složení vnitřní a vnější vrstvy

membránové dvouvrstvy

- aktivní transportéry

- efluxní systémy P-gp

- aktivní enzymy v membráně – možnost metabolizace látky během permeace

Modely s umělou membránou

- Paralelní testování na umělé membráně (Paralell artificial-membrane permeability assay - PAMPA)
- sendvičové mikrodestičky pokryté fosfolipidovou membránou
 - složení fosfolipidů blízké skutečné membráně
 - umožňuje high-throughput screening

Modely s buněčnou vrstvou

permeace přes jednobuněčné vrstvy, např. kultivovaných caco-2 epiteliálních buněk