



ALFONSO POZZAN, STEFANO FONTANA, SIMONE BRAGGIO
 DRUG DESIGN AND DISCOVERY DEPARTMENT (DD&D)
 APTUIT, AN EVOTEC COMPANY RESEARCH CENTRE, VERONA
 ALFONSO.POZZAN@APTUIT.COM

PREDIZIONE DI PROPRIETÀ ADME/PK NELLA RICERCA DI NUOVI FARMACI

Le proprietà ADME/PK di un potenziale farmaco devono essere tali da poter garantire una presenza sufficiente (per tempo di residenza e per concentrazione) in corrispondenza del sito d'azione del principio attivo. E questo a fronte di un dosaggio sufficientemente basso da limitare ogni effetto indesiderato. Allo scopo di aumentare la probabilità di ottenere molecole con queste caratteristiche la predizione delle proprietà ADME/PK diventa di fondamentale importanza. Dalle numerose analisi condotte negli ultimi vent'anni risulta che molto si può già fare utilizzando strumenti come l'analisi delle proprietà chimico-fisiche e la costruzione di modelli più complessi e mirati.

Ogni chimico medicinale che si occupi di drug discovery sa molto bene quanto gli studi *in vitro* di Assorbimento Distribuzione Metabolismo ed Escrezione (ADME) e gli studi *in vivo* di farmacocinetica (PK) siano fondamentali per l'identificazione di molecole candidate alle fasi pre-cliniche e cliniche. Sono, infatti, le proprietà ADME che consento-

no, a chi si occupa di sviluppo farmaceutico, di poter comprendere con studi di efficacia e tossicologia la reale potenzialità per una molecola di diventare un farmaco. Per quanto possibile, è quindi opportuno incorporare fin da subito quelle caratteristiche chimico-fisiche che potranno in futuro garantire un buon profilo ADME/PK. In Fig. 1 abbiamo riportato

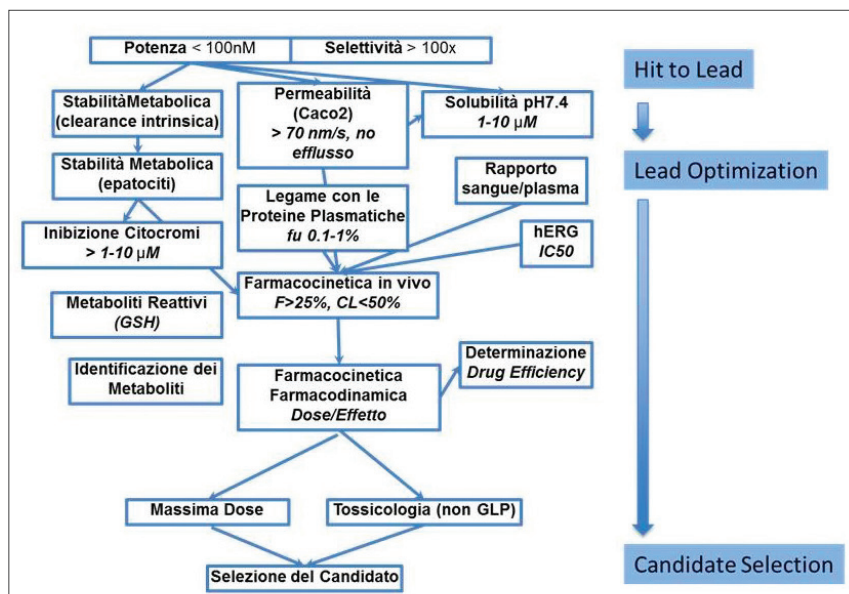


Fig. 1 - Esempio di cascata di screening per un progetto di ricerca per nuovi farmaci. Si notino il numero di saggi relativi a studi di ADME/PK

una possibile cascata di screening per un progetto di drug discovery. Ad ulteriore conferma dell'importanza di questi studi di ADME, notiamo come a valle degli studi di affinità/selettività trovano spazio un notevole numero di screening ADME/PK.

Inoltre, è interessante notare come all'incremento delle capacità di screening biologici (HTS) osservato negli ultimi 10/15 anni e la richiesta di accorciare i tempi necessari per identificare un candidato preclinico, sia seguita una crescente domanda di dati ADME/PK. Le analisi dei dati generati e lo sviluppo di metodologie computazionali stanno dando un notevole impulso all'*in-silico* ADME/PK, contribuendo ad un miglioramento sostanziale dei processi di drug discovery.



L'importanza delle proprietà chimico-fisiche e di semplici modelli ADME/PK

Benché lontano nel tempo (Anni Sessanta/Settanta) il lavoro di Hansch, Iwasae e Fujita [1] al Pomona College e di Chou e Jurs [2] all'Università della Pennsylvania, che portarono allo sviluppo di un algoritmo per il calcolo del $\log P$ (CLOGP), può certamente annoverarsi tra i primi metodi computazionali che poteva essere utilizzato per creare una relazione tra le proprietà chimico-fisiche e ADME delle molecole. Il ClogP e altre semplici proprietà chimico-fisiche verranno poi utilizzate da Lipinski [3] per formulare la popolare "rule of five". Il lavoro di Lipinski, derivato da un database di candidati clinici in fase II, afferma che un miglior assorbimento e permeabilità sono più probabili quando il ClogP è <5 , il peso molecolare <500 dalton, il numero di donatori di legami idrogeno (OH e NH) <5 e il numero di accettori di legami idrogeno (O e N) è <10 . L'immediatezza e la semplicità di calcolo hanno reso la regola di Lipinski una delle principali misure di "drug-likeness".

Analisi successive mostrarono, in realtà, che lo spazio chimico delle molecole sintetizzate varia a seconda del periodo storico, dell'area terapeutica, della tipologia dei target biologici, ma dipende anche da aspetti insiti nella cultura dei laboratori di ricerca. Tutti questi fattori sono stati ben descritti da Leeson e Springthorpe [4] in una dettagliata analisi del 2007, che mise in guardia la comunità scientifica riguardo il rischio associato alla candidatura di composti con ClogP maggiore di 4,5-5. Per cercare di quantificare quanto osservato venne introdotto il concetto di Liphophilicity Ligand Efficiency (LLE) dove $LLE = pIC_{50}$ (or pKi) - ClogP (o ClogD). Secondo lo studio di Leeson, i candidati clinici dovrebbero avere una $LLE > 5$, ovvero per una molecola di potenze pari a 10 nM, il valore massimo di ClogP dovrebbe essere < 3 .

L'importanza della lipofilia in rapporto alle proprietà ADME ottimali è stata in seguito confermata da diversi autori con l'introduzione di altre "rules". Nel 2010 e 2011 Young *et al.* [5, 6] introdussero due parametri: SFI (Solubility Forecast Index) e PFI (Property Forecast Index), dove $SFI = ClogP + (\text{Numero di anelli aromatici})$ mentre $PFI = \text{chromLogD}_{pH7.4} + (\text{Numero di anelli aromatici})$. Anche in questa analisi sorprende la stretta relazione che esiste tra la somma di due parametri chi-

mico-fisici e le proprietà ADME misurate. Nello studio di Young, il 67% dei candidati analizzati ha valori accettabili di solubilità, legame con le proteine plasmatiche (albumina), interazione con i citocromi, clearance intrinseca, affinità per hERG e una bassa promiscuità, se l'indice PFI è inferiore a 5. Solo la permeabilità migliora con valori più alti di PFI. È opportuno notare che nel caso dell'indice PFI si preferisce l'utilizzo di una misura cromatografica del logD rispetto a quella determinata attraverso la ripartizione ottanolo/acqua, dato che molecole poco solubili e lipofile non sempre consentono misurazioni precise con i metodi di ripartizione. Young dimostra inoltre come i valori calcolati di chromLogD correlino bene con i valori misurati sperimentalmente. Ciò consente di utilizzare il PFI anche in fase di predizione. In letteratura sono riportate altre semplici "rules" simili a quelle già menzionate: ricordiamo quella di Gleeson (rule 4/400: peso molecolare < 400 e ClogP < 4 riduce i rischi ADME) [7], o Veber (buona biodisponibilità se i legami rotabili < 10 e l'area della superficie polare (PSA) $< 140 \text{ \AA}^2$) [8]. Benché semplici regole non possano certo descrivere completamente la complessità dei fattori che contribuiscono alle proprietà ADME di una molecola, è altresì chiaro come semplici strumenti possano già fornire delle utilissime indicazioni sulla loro futura sviluppabilità. Per ovviare ad alcuni inconvenienti impliciti nelle semplici "rules", quale ad esempio la discontinuità generata da valori di cut-off, Birketon *et al.* [9] proposero un modello chiamato Quantitative Estimate of Drug likeness (QED) dove sette diverse proprietà chimico-fisiche (MW, ALOGP, HDB, HBA, PSA, ROTB, AROM, ALERTS) [10] e la presenza di gruppi potenzialmente tossici, vengono confrontate con quelle di farmaci in uso corrente al fine di ottenere un singolo parametro "quantitativo" da utilizzare per ordinare le molecole in esame secondo un *continuum* di drug-likeness. Il QED rappresenta un passo avanti nel cercare di armonizzare diversi parametri chimico-fisici, consentendo di non scartare a priori quelle molecole dove una proprietà non proprio ideale può essere tollerata nel caso tutte le altre siano all'interno di valori ottimali.

In aggiunta all'utilizzo di queste regole e modelli, quello che nel nostro lavoro di ricerca è risultato utile è la "mappatura" delle proprietà-chimico fisiche delle molecole in esame, assieme a molecole di riferimen-

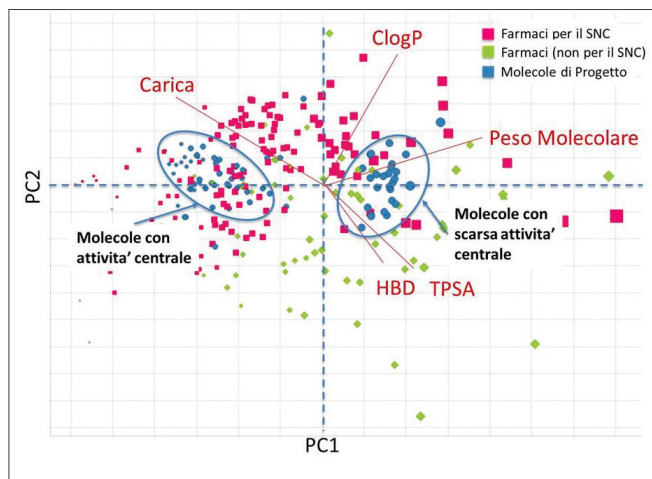


Fig. 2 - Analisi delle componenti principali dello spazio chimico fisico di un set di molecole di progetto confrontato con lo spazio occupato da farmaci sul mercato. I farmaci sul mercato sono stati divisi tra quelli attivi a livello di sistema nervoso centrale (SNC) e quelli non attivi

to, utilizzando l'analisi delle componenti principali. Come descritto in Fig. 2, una serie di molecole sintetizzate all'interno di un progetto, per un target presente sia a livello di sistema nervoso centrale che periferico, sono state mappate assieme a farmaci orali presenti oggi sul mercato. Questo tipo di analisi ha quindi permesso di differenziare, per le molecole sintetizzate, lo spazio occupato da quelle che non raggiungono il sistema nervoso centrale dallo spazio occupate da quelle che invece possono raggiungerlo.

Mappando in seguito i singoli contributi (intensità e direzione) dati dalle principali variabili utilizzate, si possono fare delle interessanti considerazioni, confermando da un lato quanto già riportato in letteratura su ciò che rende le molecole più o meno "CNS like" e, dall'altro, permettendo di modulare in modo più preciso i parametri ADME delle varie classi chimiche, direzionandole verso un'attività più periferica o centrale. Volendo riassumere alcuni semplici concetti, possiamo affermare che il calcolo di proprietà chimico-fisiche, abbinato a modelli relativamente semplici ed intuitivi, possono fornire delle valide indicazioni sulle probabili caratteristiche ADME/PK che una molecola avrà ancor prima che venga sintetizzata. Questo può trovare impiego sia a livello di drug design che come strumento per prioritizzare le molecole da caratterizzare con successivi studi *in vitro* o *in vivo* a vantaggio di una maggiore efficienza all'interno dei programmi di ricerca.

Elaborazione di modelli predittivi

Durante la progressione di un progetto di drug discovery ci si trova molto spesso a dover dare delle indicazioni più precise sui fattori che regolano le proprietà ADME/PK delle serie chimiche che si stanno ottimizzando. Contestualmente, ci si può trovare nella condizione di aver generato una cospicua quantità di dati sperimentali tali da rendere possibile la costruzione di modelli predittivi specifici. Si parla molto spesso in questo caso di modelli QSPR ovvero Quantitative Structure Property Relationship in analogia ai modelli (Q)SAR che si costruiscono a partire dai dati di attività/potenza. Il nocciolo della questione è molto simile, trovare una relazione tra la struttura chimica delle molecole e la proprietà in questione (ad esempio la permeabilità, il legame con le proteine plasmatiche, la stabilità metabolica...) misurata in un saggio *in vitro* o *in vivo*. È importante ricordare che modelli quantitativi, per definizione, generano dei numeri. Questi numeri a volte possono essere mal interpretati se non considerati all'interno del contesto specifico in cui sono stati generati, senza una solida conoscenza del dato sperimentale e del modello stesso. In una recente review prodotta nell'ambito di un consorzio composto da più industrie farmaceutiche [11] sono elencati i requisiti affinché i modelli ADME/PK abbiano un impatto nel processo di ricerca farmaceutica. Questi requisiti sono: la presenza di esperti ADME/PK con la capacità di sviluppare modelli robusti e affidabili (in genere chimici computazionali o chemoinformatici con un chiaro interesse nella comprensione delle proprietà ADME); la presenza di esperti *in-silico* e *in vitro/vivo* in grado di valutare i modelli monitorando nel tempo la qualità; una infrastruttura chemoinformatica in grado di rendere accessibili e fruibili i modelli; ricercatori e team che vogliono testare i modelli nelle loro fasi iniziali di messa a punto; educatori e promotori in grado di presentare i modelli e diffonderne il loro utilizzo con il supporto da parte del management.

Un esempio di modello predittivo QSPR: predizione della Drug Efficiency

Nel nostro gruppo di ricerca da diversi anni abbiamo introdotto il concetto di Drug Efficiency (DEff) [12-14]. Come definizione generale si tratta di misurare la concentrazione libera che una molecola raggiunge nel distretto anatomico dove si vuole ottenere l'effetto

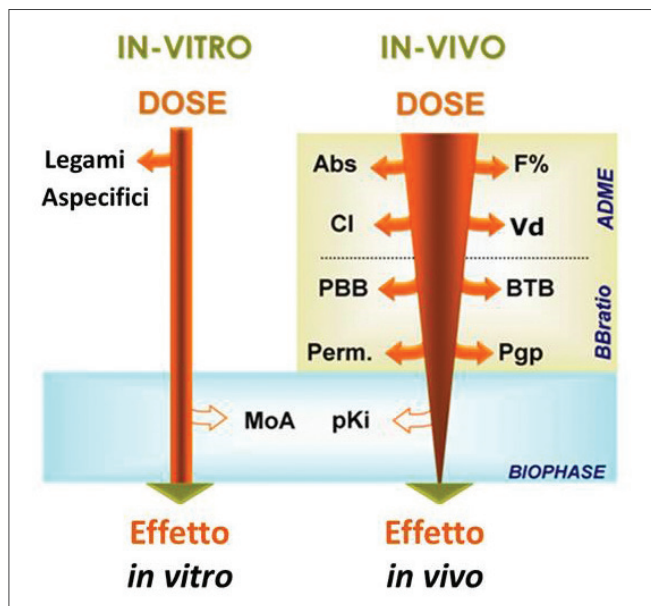


Fig. 3 - A differenza degli studi *in vitro*, dove il "100% della dose" è tutta disponibile per il target, negli studi *in vivo* le varie componenti ADME e (nel caso specifico dell'esempio) i fenomeni che regolano la distribuzione di un farmaco a livello di sistema nervoso centrale, fanno sì che solo una piccola parte della dose iniziale raggiunga il target. Legenda: Abs=assorbimento, F%=biodisponibilità, CI=clearance, Vd=volume di distribuzione, PBB=legame alle proteine del plasma o del cervello, BTB=capacità di legarsi ai tessuti cerebrali, Perm=permeabilità, Pgp=interazione con P-glicoproteine o altri trasportatori, MoA=azione farmacologica, pKi=affinità per il target

farmacologico (sistema nervoso centrale, polmone, fegato...) per poi confrontarla con la dose iniziale (Fig. 3). Questo approccio consente di ottenere una misura a valle di tutti gli effetti ADME/PK nella loro intera complessità (biodisponibilità, stabilità metabolica, fenomeni di trasporto, affinità aspecifica per proteine e tessuti...) rendendolo quindi un parametro ideale, assieme all'affinità per il target, per la selezione di candidati preclinici.

Essendo la DEff una misura *in vitro* e *in vivo*, ci siamo chiesti se fosse possibile costruire un modello QSPR per poterla predire. All'inizio la scelta è ricaduta sulla messa a punto di un modello generale per il sistema nervoso centrale utilizzando un set di circa un centinaio di molecole, tra farmaci sul mercato e candidati sviluppati all'interno di progetti di lead optimization, per le quali abbiamo misurato la CNS DEff. In Fig. 4 abbiamo riportato i parametri chimico-fisici calcolati e utilizzati inizialmente per la costruzione del modello. Tali parametri sono stati organizzati come matrice di correlazione al fine di identificare l'esistenza di sem-

plici relazioni con la DEff (logDE nel grafico), ancor prima della costruzione del modello di predizione. Dalla Fig. 4, all'incrocio della prima riga (logDE) con le colonne ClogP, ClogD e TPSA si osservano delle probabili correlazioni indicate da sfere di colore più intenso. Ci si può quindi aspettare da queste variabili un maggior contributo al modello predittivo. La matrice di correlazione consente anche di valutare in prima approssimazione le reali dimensioni dei dati utilizzati. Dato che variabili molto correlate tra di loro (ad esempio peso molecolare, numero di atomi e rifrattività molare) contengono informazioni per certi versi ridondanti.

Ci sono varie tecniche che consentono di costruire modelli a partire da un set di variabili e un set di dati sperimentali. Nella nostra esperienza quelli che si sono rivelati più utili e semplici da implementare

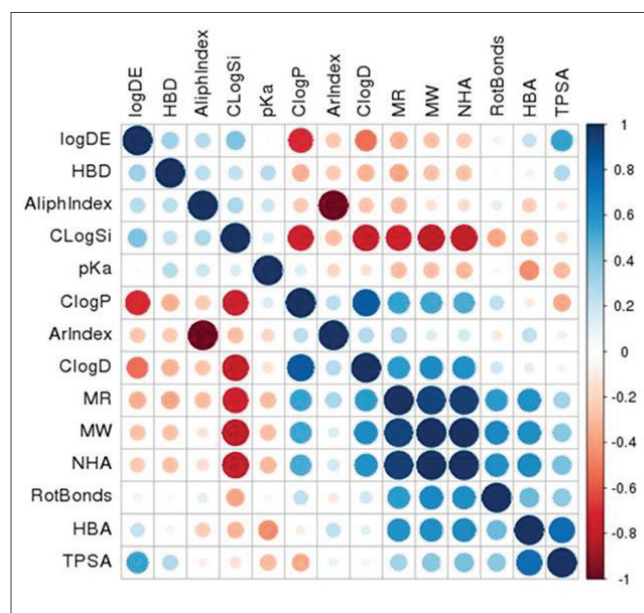


Fig. 4 - Matrice di correlazione per una serie di proprietà chimico-fisiche calcolate [si veda la nota 15 per una loro spiegazione] e il logDEff (logDE). All'incrocio tra riga e colonna viene riportato il coefficiente di correlazione utilizzando il codice colore (da blu a rosso) sulla destra. Valori positivi in blu indicano una correlazione diretta tra le variabili, valori negativi (colore rosso) indicano una correlazione inversa. La diagonale della matrice rappresenta la variabile contro se stessa e quindi la correlazione (positiva) è uguale a 1. Nel nostro caso è possibile osservare come in corrispondenza della prima riga (logDE) due possibili correlazioni sono suggerite dalla sfera rossa di intensità -0,7 per ClogP e quella azzurra di intensità 0,6 per l'area della superficie polare (TPSA). La matrice di correlazione consente di osservare come i parametri chimico-fisici sono correlati tra loro. Alcuni di questi parametri potranno essere in seguito eliminati senza perdere in "contenuto informativo".

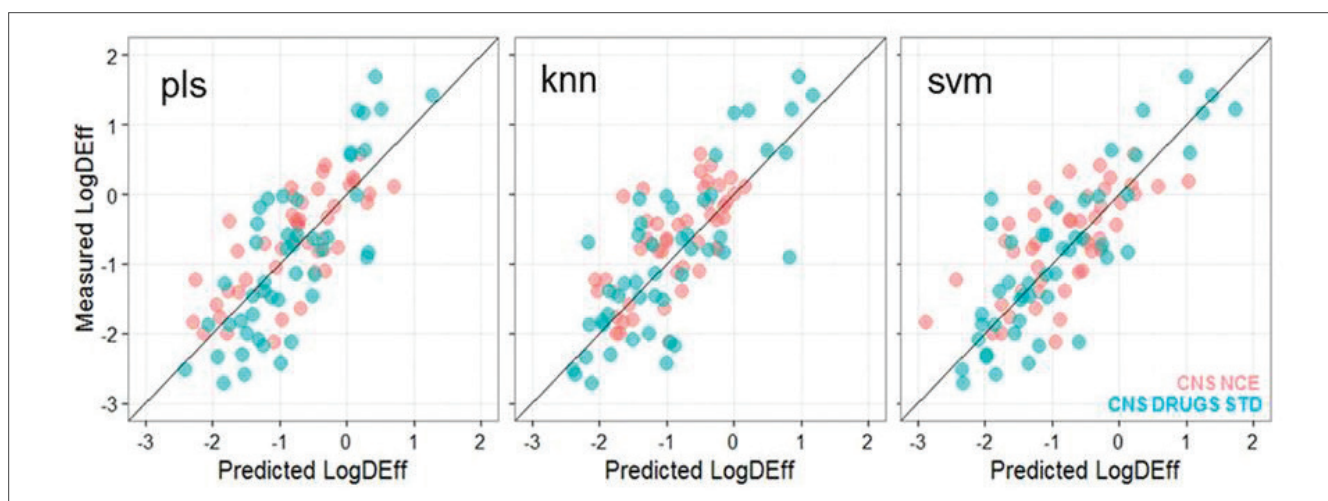


Fig. 5 - Tre modelli di predizione della DEff (logDEff) preparati utilizzando tre diverse metodiche (PLS, KNN e SVM) a partire dallo stesso set di dati ed utilizzando il modello minimo di cross validazione Leave One Out (LOO). Legenda: CNS NCE= candidati per il sistema nervoso centrale. CNS DRUGS STD= farmaci per il sistema nervoso centrale

sono la PLS (Partial Least Square), la kNN (Nearest Neighbours learning machine) e la SVM (Support Vector Machines). Questi metodi consentono di creare sia modelli lineari (PLS) che non lineari (kNN e SVM). Un modello PLS consente di capire in modo chiaro quello che è l'effetto dei singoli parametri. Modelli costruiti con altri metodi, come kNN e SVM, riescono in genere a migliorare le prestazioni predittive a scapito di una maggior difficoltà nell'interpretare il ruolo e il contributo delle singole variabili. Resta fondamentale, per tutti i casi, la verifica delle capacità predittive dei modelli utilizzando, oltre alla validazione interna (i.e. cross validation) anche data-set esterni a quelli utilizzati durante le fasi di messa a punto del metodo. Solo in questo modo si riesce a comprendere il reale campo di applicazione del modello e quanto questo sia

predittivo e/o descrittivo in relazione ai dati utilizzati. In Fig. 5 è possibile osservare tre modelli di predizione della DEff con valori di validazione interna Q^2 variabile da 0,57 a 0,63 a seconda del metodo utilizzato. La domanda che ci si pone ora è: possiamo utilizzare questo modello per la predizione della DEff di molecole completamente diverse per serie chimica e livello di ottimizzazione per il sistema nervoso centrale? Quello che abbiamo osservato, in questo caso, è un peggioramento della predizione rispetto a quelli precedenti. Confrontando i valori predetti di DEff nel caso del set esterno (Fig. 6 grafico al centro) si può osservare un generale slittamento dei punti rispetto a quanto misurato sperimentalmente. Se invece il modello viene ricostruito utilizzando la nuova serie di molecole (Fig. 6, grafico a destra) il modello migliora la loro predizione.

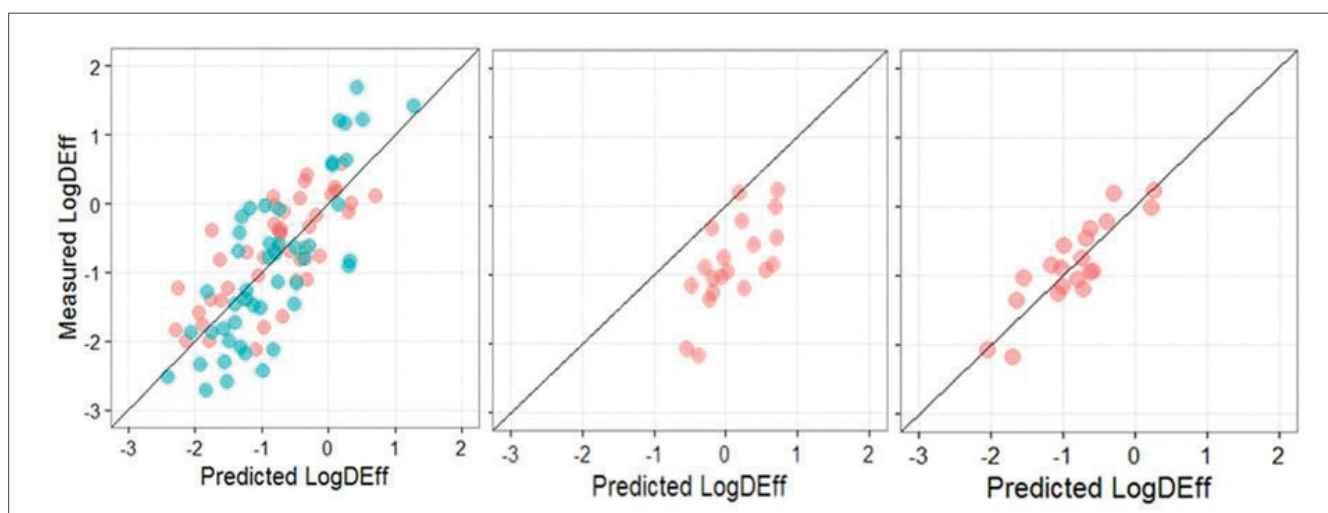


Fig. 6 - Nel grafico a sinistra è visualizzato il modello PLS di predetti contro valori sperimentali di DEff sviluppato a partire da un set di molecole CNS (in colore rosso i farmaci e in azzurro i candidati). Nel grafico al centro il modello di sinistra è applicato ad un set esterno in colore rosso. Nel grafico a destra è visualizzato un modello PLS ricalcolato *ad hoc* sul set esterno sempre di colore rosso



Il problema di fondo risiede nella diversa risoluzione dei modelli. Un modello generale consente di catturare i parametri che determinano grandi variazioni di DEff (ad esempio peso molecolare e lipofilia). Trasferendo la predizione a classi chimiche completamente diverse, con piccole variazioni di proprietà chimico-fisiche, non si riescono ad ottenere le stesse prestazioni. In questo caso è necessario ricorrere a modelli "locali" preparati su serie analoghe e, nel contempo, ricercare nuove combinazioni di descrittori e metodi per migliorare la predizione. Non sempre i modelli si comportano allo stesso modo; è per questo che di volta in volta bisogna valutarne il reale campo di applicazione, adattandoli, se necessario, al contesto preciso del progetto.

Alcune considerazioni conclusive

Nell'esempio di predizione della DEff, tutte le proprietà ADME/PK di una molecola sono considerate in modo implicito; tuttavia la costruzione di modelli per singole proprietà ADME è molto importante per cercare di migliorare quegli aspetti che risultano maggiormente critici per la serie di molecole in esame. La metodica generale che si può seguire per costruire questi modelli è simile a quanto descritto. Esistono tuttavia anche altre metodiche che si possono utilizzare. Un esempio è l'utilizzo di descrittori 3D(3D-QSPR) calcolati su una o più conformazioni delle molecole in esame o l'utilizzo di modelli strutturali, come il docking delle molecole nei citocromi o l'utilizzo di calcoli quanto-meccanici per predire la formazione di metaboliti reattivi. La collaborazione tra chimici medicinali, chimici computazionale e ricercatori DMPK e l'utilizzo dell'*in-silico* ADME/PK durante le fasi di discovery può realmente aumentare la probabilità di trovare candidati con un favorevole profilo farmacocinetico e farmacodinamico.

Bibliografia

- [1] T. Fujita, J. Iwasa, C. Hansh, *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, **86**, 5175.
- [2] J. Chou, P.J. Jurs, *Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1979, **19**, 172.
- [3] C.A. Lipinski *et al.*, *Adv. Drug Del. Rev.*, 1997, **23**, 3.
- [4] P.D. Leeson, B. Springthorpe, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007, **6**, 881.
- [5] A. Hill, R. Young, *Drug discovery today*, 2010, **15**, 648.
- [6] R. Young *et al.*, *Drug discovery today*, 2011, **16**, 822.
- [7] M.P. Gleeson, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 817.
- [8] D.F. Veber *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 2615.
- [9] G.R. Bikerton *et al.*, *Nat. Chem.*, 2012, **4**, 90.
- [10] MW=peso molecolare, ALOGP=LogP calcolato con il metodo basato sul contributo dei singoli atomi, HDB=numero di atomi donatori di legami idrogeno, HBA=numero di atomi accettori di legami idrogeno, PSA=area della superficie polare, ROTB=numero di legami rotabili, AROM=numero di anelli aromatici, ALERTS=numero di gruppi reattivi/tossici.
- [11] F. Lombardo *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2017, **60**, 9097.
- [12] S. Braggio *et al.*, *Expert Opin. Drug Discov.*, 2010, **5**, 1.
- [13] T. Rossi, S. Braggio, *Curr. Op. Pharmacol.*, 2011, **11**, 515.
- [14] K.D. Read, S. Braggio, *Exp. Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 2010, **6**, 337.
- [15] MW=peso molecolare, MR=refrattività molare, ClogP, ClogD, ClogS=solubilità calcolata, pKa, HDB=numero di atomi donatori di legami idrogeno, HBA=numero di atomi accettori di legami idrogeno, NHA=numero di atomi escluso gli idrogeni, TPSA=area della superficie polare, ArIndex, AliphIndex=frazione di atomi alifatici e aromatici, RotBonds=numero di legami rotabili.

Prediction of ADME/PK Properties in Drug Discovery

ADME/PK properties of a drug needs to guarantee a minimum concentration of the active principle (residence time and concentration) at the biophase. This needs to be achieved with a dose, low enough to prevent any adverse effect. In order to increase the probability to obtain molecules with such properties the prediction of ADME/PK become fundamentally important. From the studies carried out during the last 20 years it is emerging that we can do many "predictions" already using methods involving the analysis of the physicochemical properties and the elaboration of more complex and focused models.