



# Metodologie di Sintesi e Sviluppo Farmaceutico

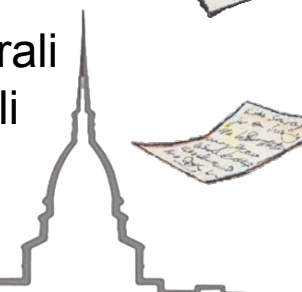
*Synthesis and Development Pharmaceutical Methodologies*

Laurea Magistrale in Chimica a.a. 2018/2019



## LogP and Log D (*Druggability*)

- Capacità di giudicare una sostanza in termini di polarità/lipofilia
- Capacità di correlare lo stato fisico con la presenza di elementi strutturali
- Capacità di correlare la solubilità con la presenza di elementi strutturali
- Applicazione in Chimica Farmaceutica: concetto di *druggability*



# Druggability

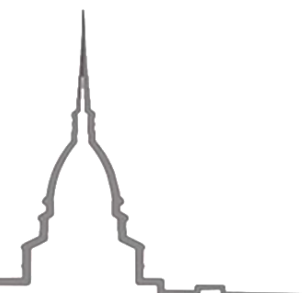
Ligand side

## The Lipinski “rule of five”

In the original Lipinski paper was started that poor absorption or permeation are more likely when:

- 1) In the structure are present more than 5 hydrogen-bond donors (HBD).
- 2) The MWT is over 500 Daltons
- 3) The LogP is over 5 (or MLogP is over 4.15).
- 4) There are more than 10 H-bond acceptors.
- 5) Substrates for biological transporters are exceptions to the rule.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Freeney PJ. *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings.* 1997. *Adv Drug Deliv Rev* 23, 3 - 25.



# The chemio-physical constant

Some examples:

Melting point (mp),

Boiling point (bp)

Solubility

$\log P$ ,

$pK_a$ ,

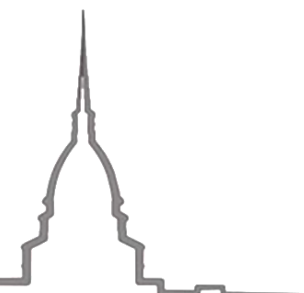
Density

Viscosity

Chromatografic retention time (Rf)

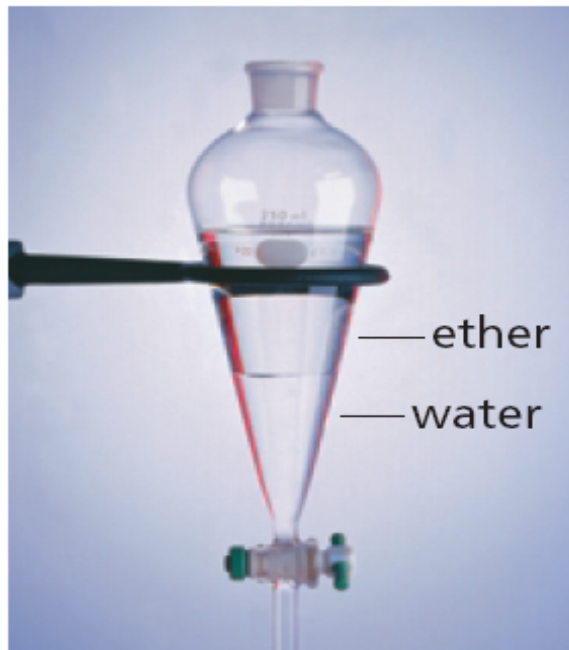
IR Vibration frequency,

NMR *chemical shift*, .....



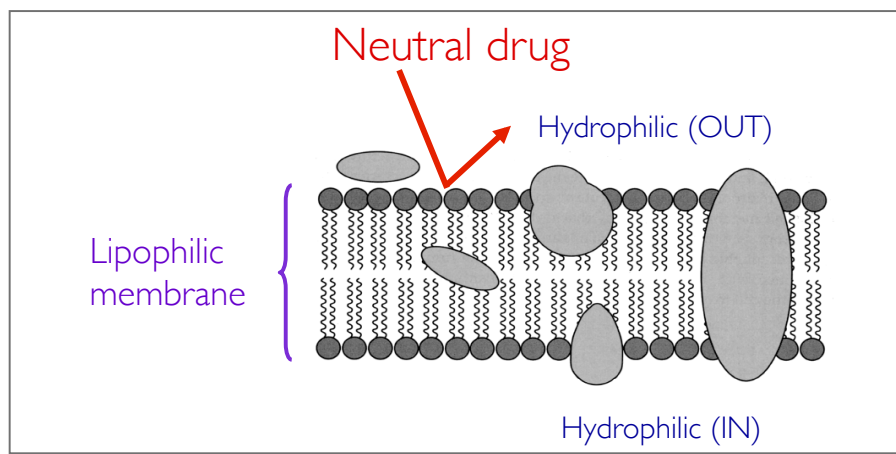
# Lipophilicity: repartition coefficient (**log P**)

Il parametro che misura la lipofilia di una sostanza è il suo **coefficiente di ripartizione** (di solito indicato con la lettera “P”, per “*partition*”) misurato utilizzando due solventi tra loro non miscibili: di solito uno è di natura organica e l’altro è l’acqua.



$$P = \frac{[\text{solute}] \text{ soluz. organica}}{[\text{solute}] \text{ soluz. acquosa}}$$

# Lipophilicity: repartition coefficient ( $\log P$ )



Polarity reduce per membrane passage

## Repartition coefficient ( $P$ ):

a chemiophysical constant dependent from Temperature and Pressure

- $\log P > 0$  Lipophilic substances
- $\log P < 0$  Hydrophilic substances
- $\log P = 0$  medium polarity

$$\log P = \log \frac{[C]_{\text{org}}}{[C]_{\text{w}}}$$

$\log P$

# Lipophilicity: repartition coefficient (log P)

Il n-ottanolo e l'acqua costituiscono la coppia standard di solventi utilizzata per determinare i coefficienti di ripartizione dei farmaci.

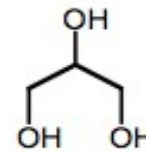
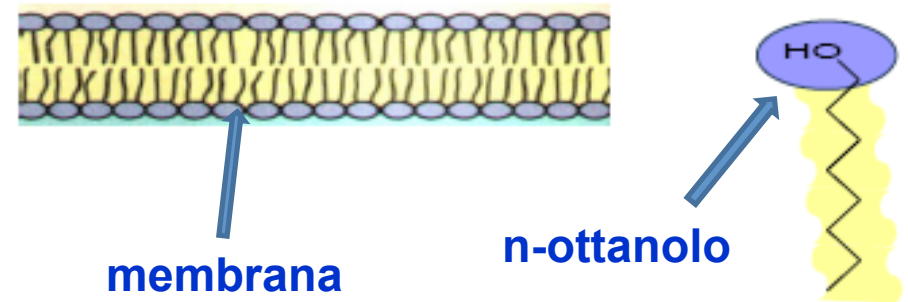
Il n-ottanolo è scelto perché mima le proprietà anfipatiche, teste polari e catene lipofile, dei fosfolipidi che costituiscono le membrane cellulari.

In genere si adopera il logaritmo decimale del coefficiente di ripartizione (logP).

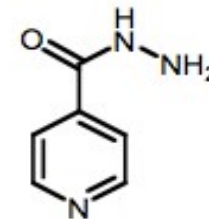
$$\log P_{\text{oct}} = \log \frac{[C]_{\text{oct}}}{[C]_{\text{w}}}$$

In base al valore di logP possiamo classificare i farmaci in tre categorie:

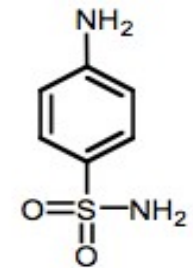
- idrofobici o lipofili o apolari, con  $\log P > 0$ ;
- idrofili o polari, con  $\log P < 0$ ;
- di media polarità, con logP intorno a 0.



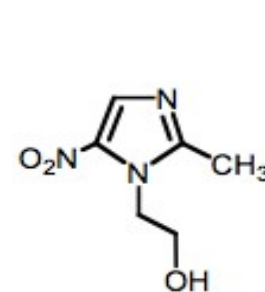
glicerina  
logP = -2,42



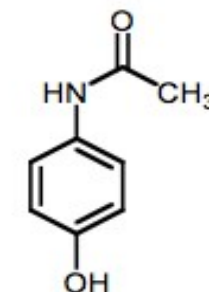
isoniazide  
logP = -0,70



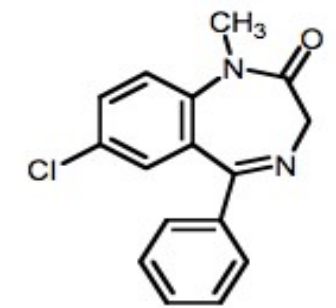
sulfanilamide  
logP = -0,62



metronidazolo  
logP = -0,02



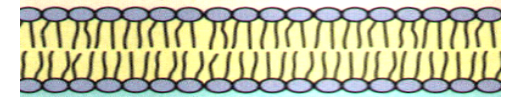
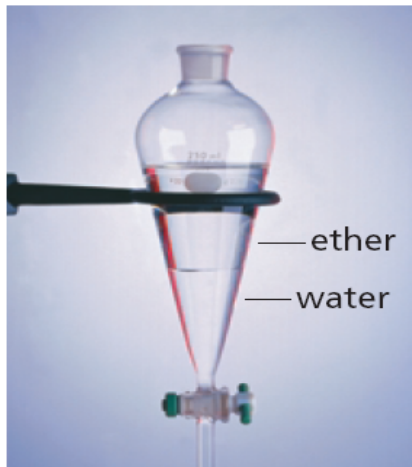
paracetamolo  
logP = 0,51



diazepam  
logP = 2,99

# Lipophilicity: repartition coefficient ( $\log P$ )

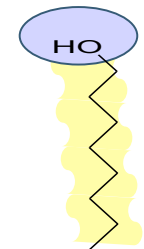
Uno dei metodi più classici e affidabili per la determinazione del coefficiente di ripartizione  $P$  di una sostanza è il metodo shake-flask, in cui due fasi tra loro immiscibili vengono dibattute in un imbuto separatore, e dopo separazione viene determinata la concentrazione dell'analita in ciascuna delle due fasi.



- Metodo dello **shake-flask**

Coppia di ripartizione: **n-ottanolo/H<sub>2</sub>O**

- **RP-HPLC**: correlazione tra tempo di ritenzione e  $\log P_{\text{oct}}$



eq. di Collander  $\log P_{\text{oct}} = a \log k_w + b$

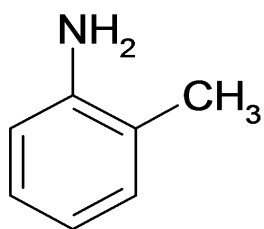
# Calcolo del logP: clogP

Diversi software (diversi metodi di predizione) permettono di calcolare il logP riferito al sistema n-ottanolo/H<sub>2</sub>O

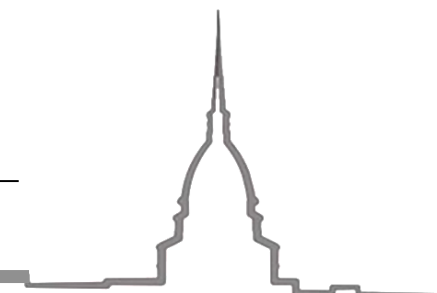
natura additiva dei valori di idrofobicità (frammenti, contributi atomici)

clogP = somma algebrica dei vari punteggi ricavati correlando numerosi valori sperimentali di logP con le rispettive strutture; le correlazioni consentono di parametrizzare atomi, raggruppamenti atomici ed “effetti di interazione” tra i sostituenti e di assegnare a ciascuno di questi fattori un punteggio di lipofilia

## Es. o-metilanilina (programma BioByte)



1 raggruppamento amminico		-1
1 C alifatico		+0.195
6 C aromatici	(6 × 0.130)	+0.780
7 H su carboni	(7 × 0.227)	+ 1.589
1 legame benzilico		-0.150
1 orto-interazione		-0.050
		<hr/>
logP <sub>(exp)</sub> = +1.32	clogP	+1.364

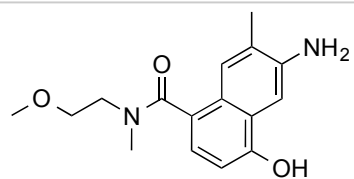




# Esercizio di Competenza # 7

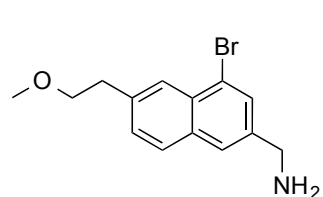
La **molecola A**, che inizialmente considerate, possiede una scarsa solubilità acquosa che si associa ad un comportamento idrofobico. Sospettando la presenza di gruppi ionizzabili, misurate la  $pK_a$ , ottenendo un valore di sperimentale di circa 2. Tale valore si alza se la misura viene condotta in miscela acqua-metanolo (10 % v/v). Successivamente considerate anche una seconda molecola (**B**), anch'essa possedente una scarsa solubilità acquosa. La struttura tuttavia mostra solubilizzarsi meglio a  $pH > 7$  (basici). Si osserva anche un aumento a  $pH$  acidi (circa 1, singola misura).

Identificare **A** e **B** all'interno del pool



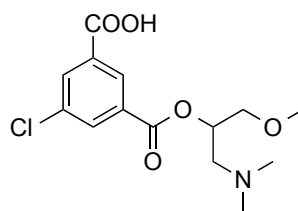
**A**

Log P: 1,55



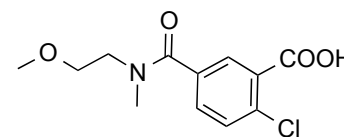
**B**

Log P: 2,97



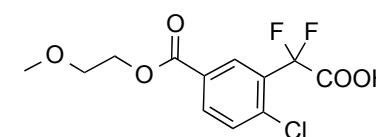
**C**

Log P: 1,79



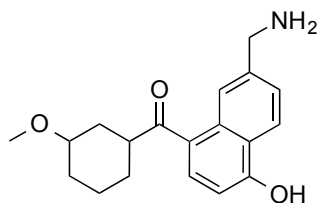
**D**

Log P: 1,37



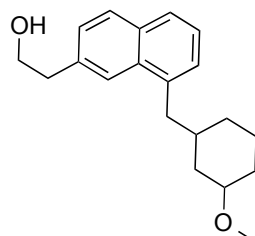
**E**

Log P: 2,42



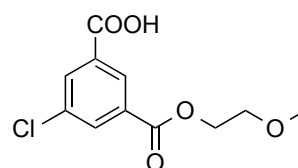
**F**

Log P: 2,1



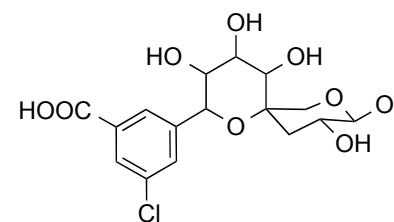
**G**

Log P: 4,27



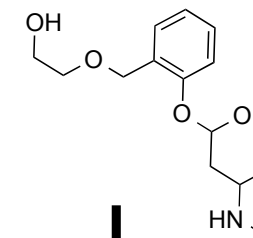
**H**

Log P: 1,81



**I**

Log P: -0,98



**L**

Log P: 1,21

# Lipophilicity: repartition coefficient ( $\log P$ )

La lipofilia di una molecola dipende dalla sua struttura, dalle interazioni idrofiliche o idrofobiche che si instaurano tra le sottostrutture che la compongono e il mezzo.

## Idrofobicità dei principali gruppi funzionali

sostituente	caratteristiche di polarità
-CH <sub>3</sub> , C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	idrofobici
-Ph	Idrofobico
-Cl, -Br, I	idrofobico
-CF <sub>3</sub>	idrofobico
-SCH <sub>3</sub>	idrofobico
-OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	idrofobico
-OCH <sub>3</sub>	debolmente idrofilo
-NO <sub>2</sub>	debolmente idrofilo
-SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	idrofilo
-CONH <sub>2</sub>	idrofilo
-COCH <sub>3</sub>	idrofilo
-CHO	idrofilo
-CH <sub>2</sub> OH	idrofilo
-NH <sub>2</sub>	idrofilo
-COOH	idrofilo
-OH	Idrofilo
-COO <sup>-</sup> , -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	molto idrofili

sostituenti che contribuiscono ad incrementare la lipofilia della molecola: privi di atomi che formano legami idrogeno

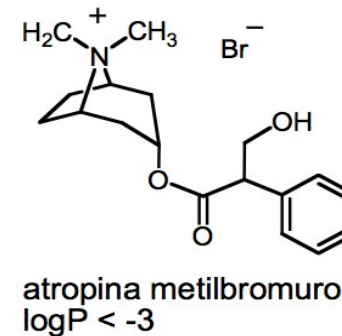
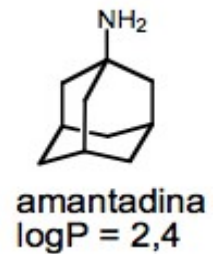
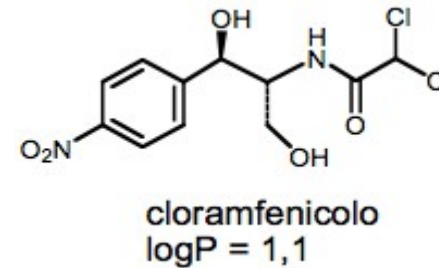
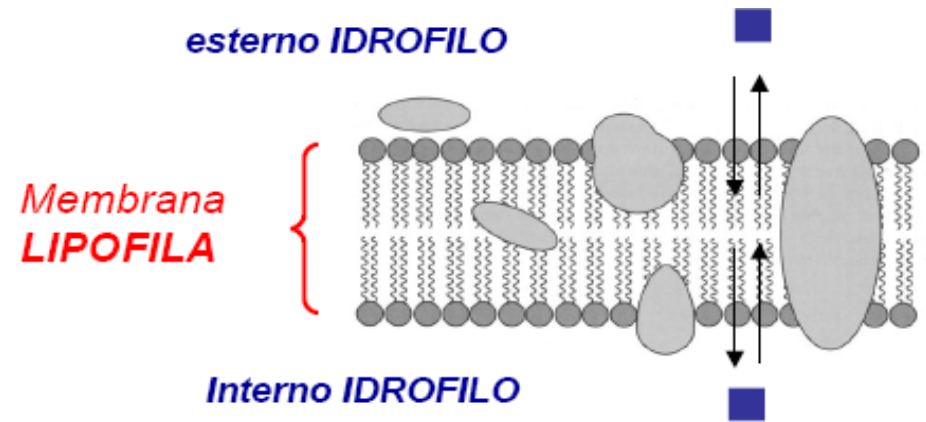
sostituenti che contribuiscono a ridurre la lipofilia della molecola: gruppi che formano legami idrogeno con l'acqua e/o sono ionizzabili a pH fisiologico



Oltre al logP altre proprietà fisiche concorrono a determinare la capacità di attraversamento delle membrane per diffusione passiva, in particolare il comportamento acido-base e le dimensioni molecolari.

In prima approssimazione, è possibile prevedere che un farmaco con un logP positivo, non troppo voluminoso e non permanentemente carico, sarà in grado di diffondere passivamente attraverso le membrane cellulari.

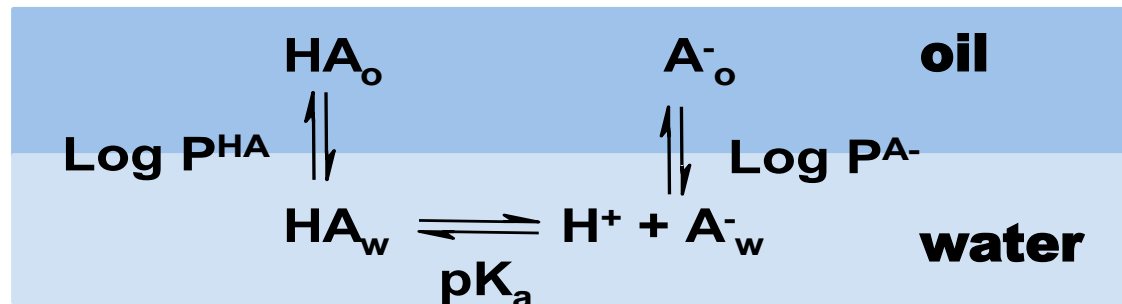
Nelle figure a lato: il **cloramfenicolo** e l'**amantadina**, ma non l'atropina metilbromuro, attraversano le membrane cellulari.



# Lipofilia e comportamento acido-base

Gli acidi e le basi deboli sottoposti a ripartizione tra due solventi non miscibili partecipano a due equilibri simultanei:

- ripartizione della specie neutra tra la fase acquosa e la fase organica (Log P);
- acido-base che ha luogo esclusivamente nella fase acquosa pK<sub>a</sub>.

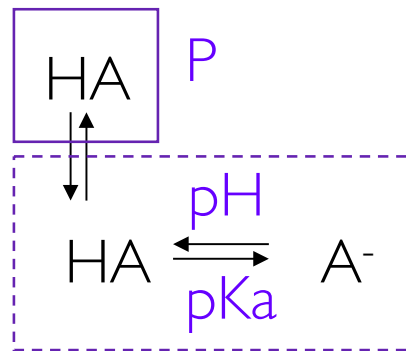


La ripartizione complessiva che risulta dai due equilibri è espressa dal **coefficiente di distribuzione** (D) o, più frequentemente, dal logD.

Per un dato soluto, il valore di P è una proprietà intrinseca (della specie neutra), mentre il valore di D varia in funzione del pH.

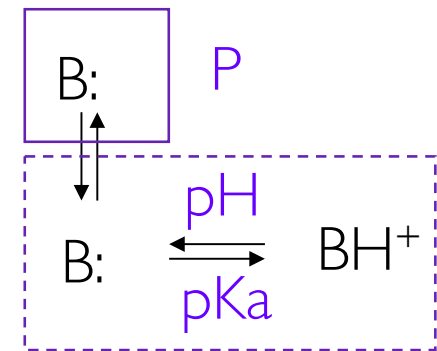
# Distribution coefficient: $\log D$

Polar solvent

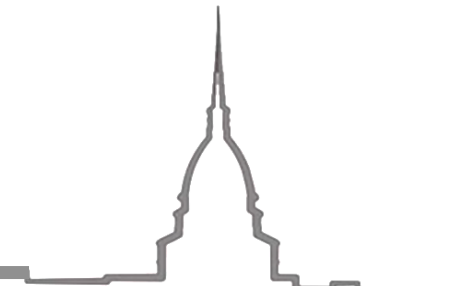


Water

Apolar solvent



Water



# Calcolo del logD

Lipofilia

approssimazione: forma ionizzata illimitatamente idrofila  $\Rightarrow$  incapace di ripartirsi in  $H_2O$

$$D = \frac{[HA]_{\text{apol}}}{[HA]_{\text{acqua}} + [A^-]_{\text{acqua}}}$$
$$D = \frac{P \cdot \frac{[HA]}{[HA]_{\text{aq}}}}{\frac{[HA]}{[HA]_{\text{aq}}} + \frac{[A^-]}{[HA]_{\text{aq}}}}$$

$[A^-]/[HA] = 10^{(pH - pKa)}$

per acidi deboli

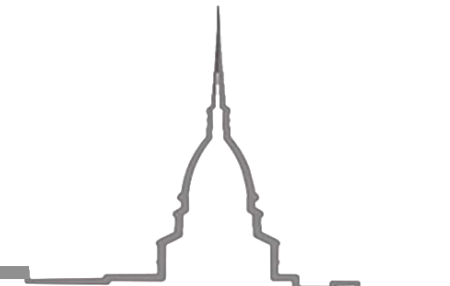
$$D = \frac{P}{1 + 10^{(pH - pKa)}}$$

$P \Rightarrow$  costante termodinamica della specie neutra

per basi deboli

$$D = \frac{P}{1 + 10^{(pKa - pH)}}$$

$D \Rightarrow$  varia in funzione del pH



## Limitazioni:

- nella fase organica possono trasferirsi piccole quantità di coppie ioniche ( $A^- \cdots Na^+$ ,  $BH^+ \cdots Cl^-$ )
- il soluto non si ionizza solo nella soluzione acquosa ma anche nel n-ottanolo (anche se in misura modesta)

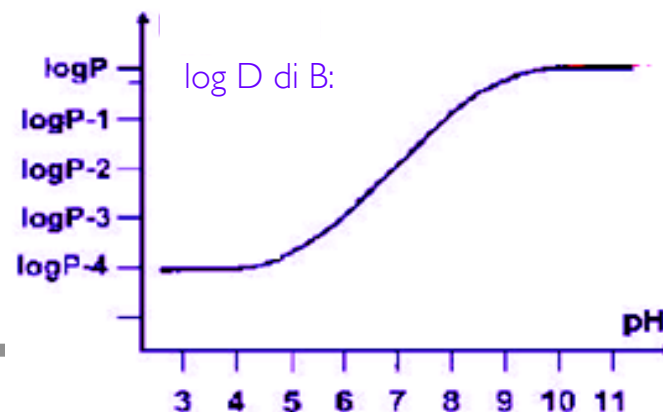
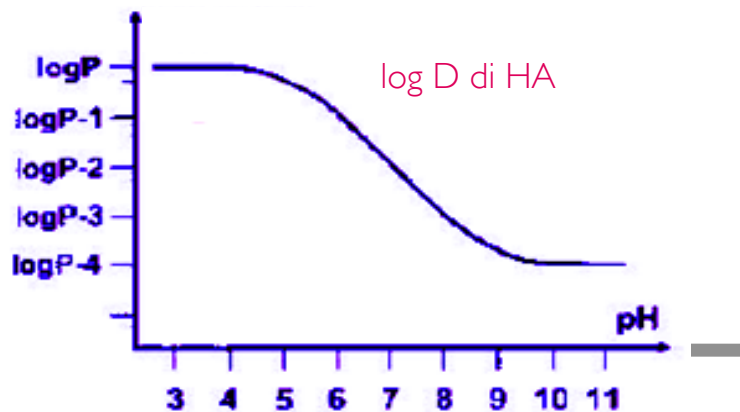
Es. calcolo del log D per HA con  $P = 10$  e  $pK_a = 5$

$$D = \frac{P}{1 + 10^{(pH - pK_a)}}$$

$$pH = 3 \quad D = \frac{10}{1 + 10^{(3-5)}} = \frac{10}{1 + 0.01} \cong 10 \Rightarrow \log D \cong 1$$

$$pH = 5 \quad D = \frac{10}{1 + 10^{(5-5)}} = \frac{10}{1 + 1} = 5 \Rightarrow \log D = 0.7$$

$$pH = 7 \quad D = \frac{10}{1 + 10^{(7-5)}} = \frac{10}{1 + 100} \cong 0.1 \Rightarrow \log D \cong -1$$



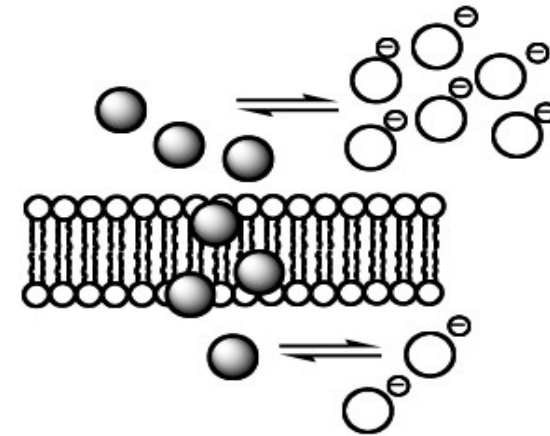
log D < 3-4 unità ↓  
rispetto al log P



In prima approssimazione, possiamo ritenere che solo la quota di un acido indissociato, in equilibrio con la quota dissociata, sarà in grado di attraversare le membrane cellulari per diffusione passiva.

Tale processo dipende dal  $\log P$  e dalla  $pK_a$  del farmaco, oltre che dai valori di  $pH$  nell'ambiente extracellulare e nell'ambiente intracellulare.

Solo la frazione indissociata di un farmaco di natura acida attraversa agevolmente le membrane cellulari.





# Acidi e basi polifunzionali

Alcuni farmaci contengono nella loro struttura più funzioni acide o più funzioni basiche: gli equilibri sono sempre controllati dall'equazione di Henderson-Hasselbach.

L'etambutolo, un farmaco antitubercolare, possiede due atomi d'azoto basiche. L'acido diprotico coniugato ha  $pK_{a1} = 6,3$  e  $pK_{a2} = 9,5$ .

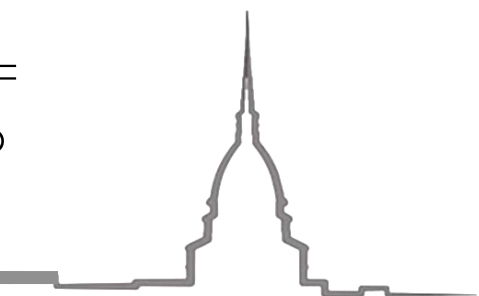
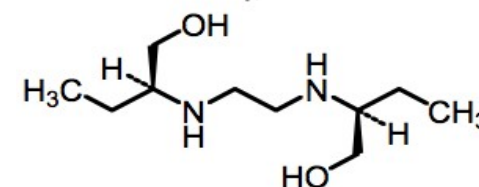
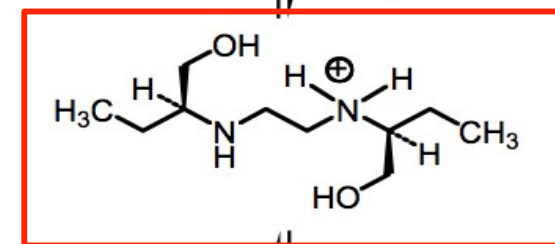
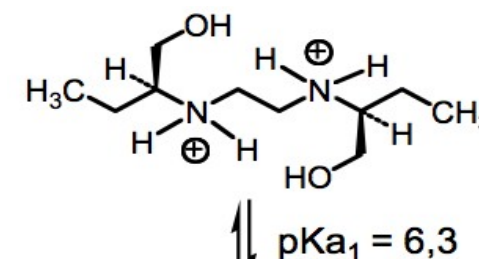
Quale specie dell'etambutolo prevale a pH 7,4?

$$\%ionizzato = 100 \frac{10^{pH-pK}}{1+10^{pH-pK_a}}$$

$$\%ionizzato = 100 \frac{10^{7.4-6.3}}{1+10^{7.4-6.3}} = 100 \frac{10^{1.1}}{1+10^{1.1}} = 100 \times \frac{12.59}{1+12.59} = 92.64$$

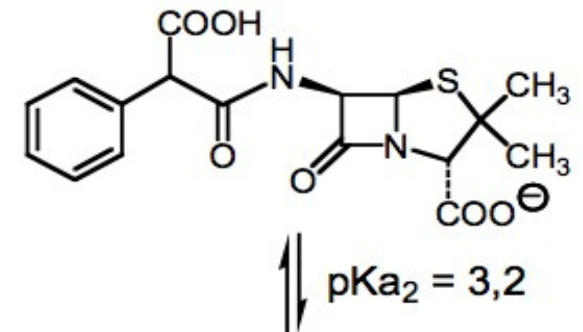
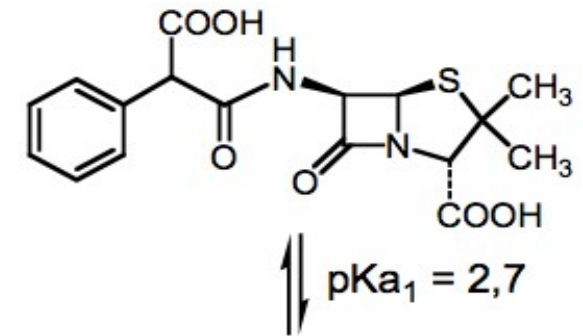
Se trascuriamo il contributo della coppia acido-base associata al  $pK_{a2} = 9,5$ , possiamo stimare che la specie monocationica prevale all'equilibrio nella misura di circa il 90%.

**90%**  
**pH 7,4**

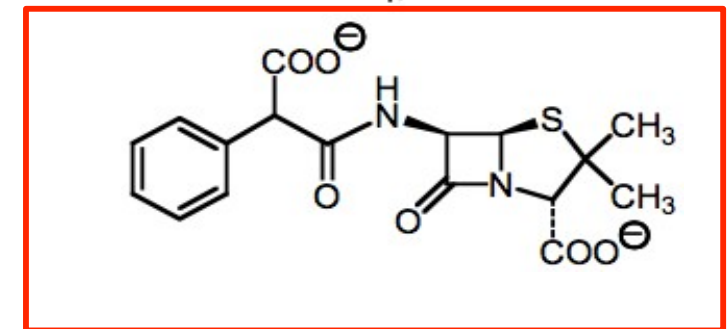


La carbenicillina è un antibiotico  $\beta$ -lattamico dotato di due gruppi carbossilici con  $pK_{a1} = 2,7$  e  $pK_{a2} = 3,2$ .

A pH 7,4 la specie predominante di questo farmaco è quella dianionica. Infatti, il pH di 7,4 è di oltre 2 unità superiore ad entrambe le  $pK_a$ .



**pH 7,4**



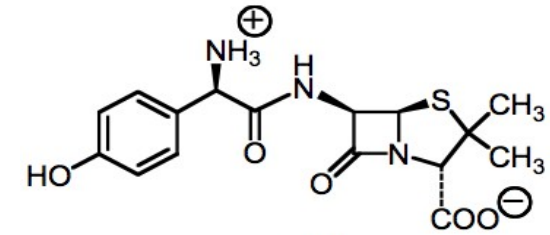
# Sostanze anfotere

Le sostanze anfotere contengono nella loro struttura almeno un gruppo acido e almeno un gruppo basico.

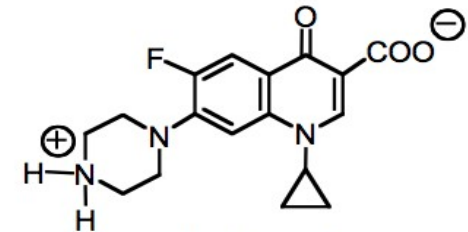
Una sostanza anfotera può esistere in soluzione come zwitterione, una specie con due cariche locali di segno opposto e una carica netta uguale a zero. Esempi di farmaci anfoteri che esistono come zwitterioni sono l'amoxicillina ( $pK_a = 2,4$  e  $pK_b = 4,4$ ) e la ciprofloxacina ( $pK_a = 6,0$  e  $pK_b = 5,2$ ).

Il punto isoelettrico (pI) è il pH al quale risulta massima la percentuale della forma zwitterionica.

Il pI di una sostanza anfotera si calcola come punto medio tra  $pK_{a1}$  e  $pK_{a2}$ .



amoxicillina



ciprofloxacina

$$pI = (pK_{a1} + pK_{a2})/2$$

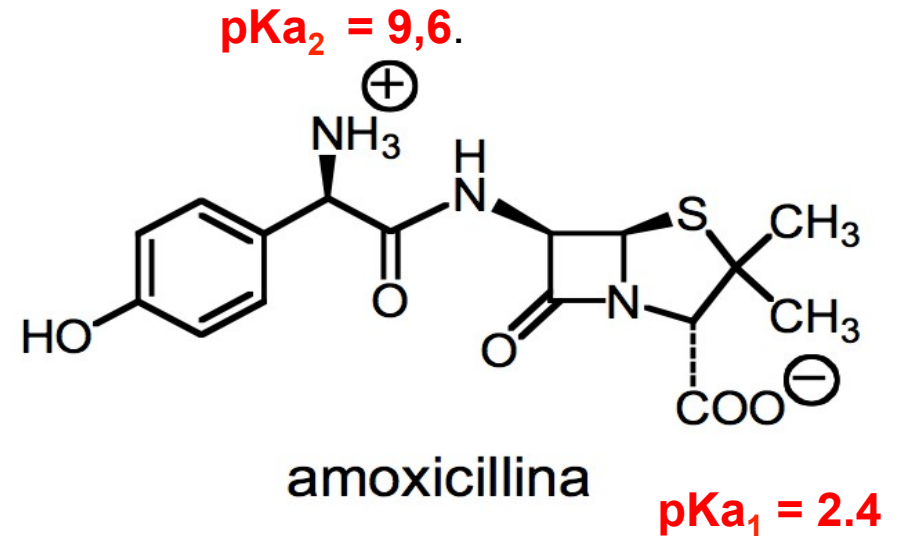


Nel caso dell'amoxicillina il  $pK_{a1}$  è 2,4 mentre il  $pK_{a2}$  è  $14 - pK_b = 14 - 4,4 = 9,6$ .

$$pI = (2,4 + 9,6)/2 = 6$$

A questo valore di pH la forma zwitterionica è quella prevalente rispetto alle altre due possibili: cationica e anionica.

Praticamente, oltre il 99,9% dell'amoxicillina si trova all'equilibrio come zwitterione.



Usando l'equazione di *Henderson-Hasselbach* è facile verificare che la specie zwitterionica prevale (> 50%) a valori di pH è compresi tra il  $pK_{a1}$  e il  $pK_{a2}$ .

La forma zwitterionica dell'amoxicillina prevale a valori di pH compresi tra 2,4 e 9,6.

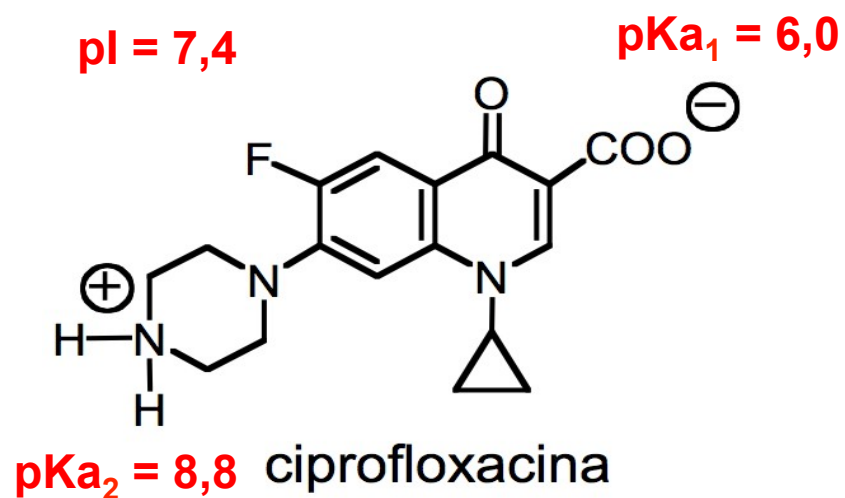
Nel caso della ciprofloxacina si ha:

$$pK_{a_1} = 6,0$$

$$pK_{a_2} = 14 - pK_b = 14 - 5,2 = 8,8$$

$$pI = (6,0 + 8,8)/2 = 7,4$$

La forma zwitterionica di questo farmaco è massima a pH 7,4 e prevale nell'intervallo di pH tra 6,0 e 8,8.

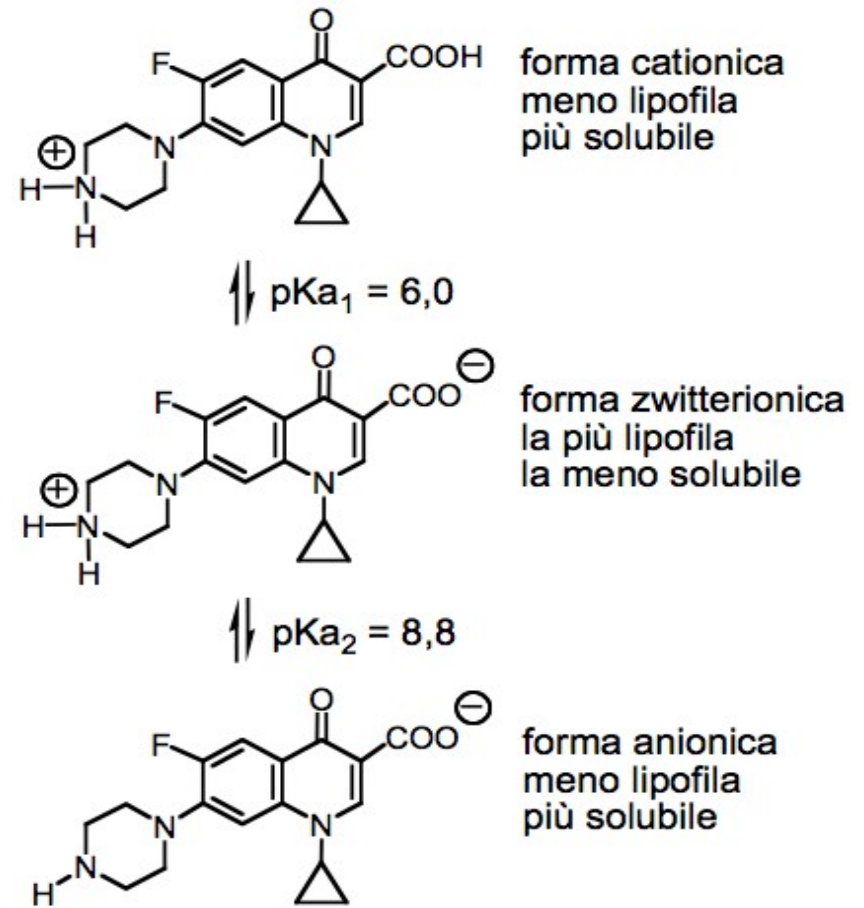


Il logD e la solubilità di una sostanza anfotera variano in funzione del pH.

Al pH isoelettrico il logD raggiunge il suo valore massimo (che coincide con il logP “intrinseco”) mentre la solubilità raggiunge il suo valore minimo.

Man mano che il pH si allontana dal punto isoelettrico prevalgono le specie ioniche: se il  $\text{pH} < \text{pI}$  prevale la specie cationica; se il  $\text{pH} > \text{pI}$  prevale la specie anionica.

In ogni caso il logD diminuirà e la solubilità aumenterà come conseguenza del prevalere di una specie ionica che è più idrofila dello zwitterione.



Lo stato di zwitterione può essere vantaggioso per un farmaco.

Essendo privi di carica netta, gli zwitterioni riescono ad attraversare le membrane cellulari più agevolmente di quanto possano fare le specie cationiche e anioniche.

Inoltre, la presenza di cariche parziali nella loro struttura conferisce agli zwitterioni, in genere, una discreta solubilità in acqua, un fattore che favorisce la biodisponibilità orale.

L'amoxicillina e la ciprofloxacina, i farmaci illustrati nelle diapositive precedenti, sono bene assorbiti in seguito a somministrazione orale.

