

Nueva estrategia computacional - experimental para la clasificación biofarmacéutica de fármacos y su implementación para la obtención de medicamentos genéricos y productos farmacéuticos de avanzada.

Autoría principal

Miguel Ángel Cabrera Pérez¹.

Otros autores

Hai Pham The¹, Marival Bermejo Sanz², Isabel González Álvarez².

Colaboradores

Dr. C. Víctor Mangas Sanjuán², Dr. C. Teresa GarriguesPeluso³, Dr. C. Huong Le ThiThu⁴, Dr. C. Maykel Cruz Monteagudo⁵, Dr. C. Inmaculada Centelles³, Dr. C. Reinaldo Molina Ruiz¹, Dr. C. Aliuska Morales Helguera¹, Dr. C. Jorge Antonio Pérez Donato¹, Dr. C. Mirta Elena Cuellar de la Cruz¹, Dr. C. Zenaida Rodríguez Negrin¹, Ms.C. Tania Betancourt Purón¹, Ms.C. Yaidel Quiñones García¹, Ms.C. Alcides Morales Guedes⁶, Lic. EvysAncede Gallardo¹, Ing. Belkis Morales Vázquez¹, Lic. Robelio Ramos Méndez¹.

Entidad ejecutora principal

¹Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV).

Entidades participantes

²Universidad Miguel Hernández de Elche, Alicante, España.

³Universidad de Valencia, Valencia, España.

⁴Escuela de Medicina y Farmacia de la Universidad Nacional de Hanoi, Vietnam.

⁵Centro de Estudios de Química Aplicada, UCLV.

⁶Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas (UCLV).

Autor para correspondencia

Dr. C. Miguel Ángel Cabrera Pérez

Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica. Centro de Bioactivos Químicos.

Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.

Carretera a Camajuaní, Km 51/2. Santa Clara, Villa Clara. C.P. 54830.

Email: macabrera@uclv.edu.cu; macabreraster@gmail.com, Fax : 281130

Aporte científico de cada autor al resultado

✓ Dr. C. **Miguel Ángel Cabrera Pérez** (35%): Es autor para la correspondencia de las 5 publicaciones referidas en este trabajo. Tutor de la tesis doctoral que forma parte de la propuesta de premio: Nuevo sistema in silico para la clasificación biofarmacéutica de fármacos. Ponente principal de los resultados científicos en los eventos internacionales. Investigador principal, por la parte cubana, de los dos proyectos internacionales que financiaron la implementación de la metodología: i)-Montaje de un laboratorio de Química Computacional, con fines académicos y científicos, para el diseño racional de fármacos en enfermedades de alto impacto social (Financiado por la AECID del 2010 al 2013 por un monto de 250000 euros); ii)-Red para el desarrollo de metodologías biofarmacéuticas racionales que incrementen la competencia y el impacto social de las Industrias Farmacéuticas Locales (Financiado por la Comisión Europea del 2011 al 2014 por un monto

de 1.017.034 euros). Dirige la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica del Centro de Bioactivos Químicos.

- ✓ Dr. C. **Hai Pham The** (30%): Es autor principal de las 5 publicaciones referidas en este trabajo. Es autor de la tesis doctoral que forma parte de este trabajo. Formó parte del grupo de investigación de los dos proyectos.
- ✓ Dr. C. **Marival Bermejo Sanz** (20%): Ha sido durante 14 años una de las principales colaboradoras del grupo de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica. Es autora de las 5 publicaciones referidas en este trabajo. Investigadora principal, por la parte extranjera, de los dos proyectos internacionales que financiaron la implementación de la metodología.
- ✓ Dr. C. **Isabel González Álvarez** (15%): Ha sido durante 14 años una de las principales colaboradoras del grupo de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica. Es autora de las 5 publicaciones referidas en este trabajo. Formó parte del grupo de investigación de los dos proyectos.

Resumen

La aplicación combinada y racional de metodologías biofarmacéuticas se consolida como una herramienta de predicción muy útil para disminuir la experimentación en seres humanos; incide indirectamente en los costos asociados a un producto; contribuye a facilitar los trámites de registros sanitarios de medicamentos y garantiza su seguridad y eficacia. Es en este contexto donde la presente propuesta de premio aborda aspectos novedosos y relevantes. En primer lugar se desarrollan y validan experimentalmente nuevos modelos computacionales, robustos y fiables, para predecir la permeabilidad intestinal in vitro en células Caco-2, así como para estimar el grado de absorción intestinal en humanos. Se desarrolla un nuevo sistema de Clasificación Biofarmacéutica Provisional que permite predecir la permeabilidad y la solubilidad en las etapas iniciales de desarrollo de medicamentos. Los modelos computacionales desarrollados muestran una eficacia adecuada y son capaces de combinarse con los modelos experimentales para la caracterización biofarmacéutica de nuevas entidades terapéuticas. Los resultados científicos de la presente propuesta quedan avalados por 5 publicaciones en revistas de alto impacto, 1 tesis doctoral y 15 presentaciones en Congresos Internacionales. La implementación de esta metodología se ha encausado a través de 2 proyectos internacionales que han permitido crear, por primera vez en Cuba, una Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica con el objetivo de contribuir al desarrollo de genéricos y productos farmacéuticos de avanzada, permitiendo un incremento de la salud de la población y a su vez la generación de bienes exportables.

Comunicación Corta

1- Introducción

La permeabilidad intestinal, la solubilidad del fármaco y la velocidad de disolución de la forma farmacéutica son las propiedades de mayor impacto en la absorción intestinal, siendo consideradas para definir el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS)¹. A su vez, los mecanismos de eflujo y el metabolismo pre-sistémico influyen de forma directa en la biodisponibilidad de los fármacos y forman parte del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica de Distribución de Fármacos (BDDCS)².

Diversas metodologías experimentales se han desarrollado para estudiar la absorción intestinal de fármacos durante el proceso de descubrimiento y desarrollo. Sin embargo, la complejidad, el costo, los aspectos éticos y la capacidad de cribado de los estudios *in vivo* en animales han incrementado el uso de los métodos *in vitro* durante el desarrollo preclínico de medicamentos³, siendo los ensayos *in vitro* en células Caco-2 uno de los más utilizados para la estimación de la permeabilidad intestinal⁴. También el desarrollo de la química combinatoria ha producido un incremento en la generación de Nuevas Entidades Moleculares (NME), motivando el uso de modelos computacionales capaces de predecir las propiedades farmacocinéticas y biofarmacéuticas a partir de la información químico-estructural⁵.

Tomando en consideración que la **determinación experimental** de la permeabilidad, la solubilidad y la susceptibilidad de metabolizarse de un candidato a fármaco **es prácticamente imposible** de implementar en las etapas iniciales de desarrollo de fármacos; que los **modelos computacionales** publicados se han basado en bases de datos pequeñas, con escasa variabilidad estructural y que han sido poco validados experimentalmente; que los modelos computacionales y experimentales **no se han combinado** para **lograr una clasificación biofarmacéutica global**; y que en nuestro país **no se ha creado la infraestructura especializada** para el desarrollo integral de estudios biofarmacéuticos aplicados al desarrollo de **genéricos y productos farmacéuticos de avanzada**, nos proponemos los siguientes objetivos:

- Desarrollar y validar modelos computacionales innovadores para la predicción de la permeabilidad, la solubilidad y el metabolismo de fármacos, que puedan ser utilizados para establecer una nueva Clasificación Biofarmacéutica Provisional tanto para fármacos como para nuevas entidades moleculares.
- Desarrollar la infraestructura necesaria para la modelación computacional y la evaluación experimental de propiedades biofarmacéuticas que contribuyan a la toma de decisión, por las Agencias Regulatorias, sobre la exoneración de ensayos de bioequivalencia en humanos.

2- Materiales y Métodos

Bases de Datos. La base de datos de permeabilidad en células Caco-2 estuvo formada por 1301 compuestos. Para clasificar los compuestos con alta permeabilidad se utilizó el valor del Metoprolol, mientras que para los de baja permeabilidad se empleó el del Manitol⁶. En ambos casos, para flexibilizar los intervalos seleccionados, se aplicó la regla del intervalo de confianza [0.8-1.25] utilizada en los estudios de bioequivalencia⁷⁻⁹. La base de datos de solubilidad estuvo formada por 1206 compuestos. Los fármacos con número de dosis ($D_0 \geq 1$) se clasificaron como de alta solubilidad de acuerdo al BCS¹⁰. La base de datos de extensión de metabolismo estuvo formada por 679 fármacos, siendo clasificados como extensivamente metabolizados y por ende altamente permeables, aquellos con un metabolismo superior al 70%¹¹.

Para estudiar las correlaciones *in vitro/in vivo* se utilizó una base de datos de Fracción Absorbida en Humanos (Fa) conformada por 825 fármacos. Para los estudios de

cribado virtual, se utilizaron bases de datos de biodisponibilidad, y diversos compuestos registrados en las bases de datos de Derwent, WOMBAT, Asinex (<http://www.asinex.com>) y Lifechemicals (www.lifechemicals.com).

Descriptores Moleculares: Se utilizaron los descriptores calculados por los programas: (i) Dragon versión 5.4 y 6.0, (ii) Volsurf+ versión 1.0.4 y (iii) CDK versión 1.3.7.

Análisis Estadístico: Como técnicas estadísticas de modelación se utilizaron: el Análisis Discriminante Lineal y Cuadrático, la Regresión Logística Binaria, los Árboles de Clasificación, los Bosques Aleatorios, las Redes Neuronales, las Redes Bayesianas y las Máquinas con Soporte Vectorial; todas implementadas en los programas STATISTICA 6.0, SPSS 17.0 y WEKA 3.6.

Selección de Variables: Para los modelos de Análisis Discriminante se utilizó el método de “*pasos hacia delante*” y de “*mejor subconjunto*”. En el caso de la Regresión Logística se empleó el método de “*adelante condicional*” para estimar el modelo. Para los árboles de clasificación se seleccionó por cada nodo la variable que desplegaba los datos en segmentos lo más homogéneos posibles con respecto a la variable dependiente. En el caso de las redes neuronales se utilizó la *selección hacia adelante*. Para cada técnica de inteligencia artificial se ensayaron los métodos de filtrado y de envoltura y con cada subconjunto seleccionado, se desarrolló un modelo.

Evaluación de Modelo. Para las técnicas estadísticas discriminantes se evaluaron diferentes parámetros estadísticos (la λ de Wilks, el valor de F , el cuadrado de la distancia de Mahalanobis, el valor de χ^2 y el estadístico de Wald). En los árboles de clasificación se especificaron los parámetros que optimizan su tamaño y desempeño. El crecimiento del árbol fue controlado utilizando la medida de impureza Gini y la optimización fue por métodos de validación cruzada. Para los Bosques Aleatorios un tercio de la serie de entrenamiento fue separada como una serie de validación interna. En el caso de las técnicas de inteligencia artificial sus parámetros se optimizaron durante el proceso de entrenamiento a través del ensayo de “*prueba y error*”. Se utilizaron los multclasificadores y se empleó el voto mayoritario simple. Los modelos obtenidos fueron validados en base a su dominio de aplicación, según el programa *AmbitDiscover*. La robustez y el poder predictivo de los modelos se corroboró por validación interna y externa. Para evaluar el desempeño de los modelos QSPR se utilizó el porcentaje de casos bien clasificados, el coeficiente de correlación de Matthews, la sensibilidad, la especificidad y la curva ROC.

Evaluación Experimental: Los estudios de permeabilidad *in vitro* se realizaron en monocapas de carcinoma de colon humano Caco-2 ATCC, y siguiendo los procedimientos técnicos establecidos y validados en el laboratorio de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Valencia en España. La corroboración de las predicciones computacionales se realizaron a través de la determinación experimental de la permeabilidad intestinal en Caco-2, en un set externo de 23 fármacos.

3-Resultados y Discusión

3.1 Modelación computacional de propiedades biofarmacéuticas de absorción. Estado del arte

Se desarrollaron dos revisiones sobre el estado del arte de la modelación computacional para la predicción de la absorción intestinal y biodisponibilidad de los fármacos. Se realizó un análisis crítico actualizado de las principales bases de datos, descriptores moleculares, así como las diferentes técnicas estadísticas que se han utilizado para predecir la biodisponibilidad, la absorción intestinal en humanos y la permeabilidad intestinal. Se demuestra que la predicción computacional de propiedades de absorción es un tema altamente complejo y que aunque se han desarrollado numerosas aproximaciones, sigue siendo un reto la creación de herramientas confiables y predictivas para su aplicación tanto en la etapa de descubrimiento como de desarrollo de fármacos.

3.2 Modelación computacional de la permeabilidad intestinal en células Caco-2 usando métodos de clasificación QSPR y modelos basados en reglas.

En un primer estudio se desarrollaron 21 modelos QSPR para discriminar los compuestos con alta permeabilidad en Caco-2 de aquellos con moderada-baja permeabilidad. El rango de exactitud de clasificación para todos los modelos estuvo entre 78-82%. Se desarrolló un modelo general de clasificación con todos los descriptores y se obtuvo un 81.6% de buena clasificación para la serie de entrenamiento y un 83.9% para la serie de prueba. Un set externo de 10 fármacos fue predicho por el modelo y corroborado experimentalmente, alcanzándose un 80% de clasificación correcta. Las potencialidades de uso del modelo se evaluó en el cribado virtual de una base de datos de 269 fármacos con valores de absorción intestinal en humanos y el modelo predijo 121 compuestos con alta permeabilidad intestinal y el 90% de ellos tenían altos valores de absorción intestinal en humanos (HIA>80%).

En un segundo estudio, se desarrollaron nuevos modelos QSPR y modelos basados en reglas para clasificar la alta (H), moderada (M) y baja (L) permeabilidad en Caco-2. La mejor regla, basada en la combinación de Área Superficial Polar, Peso Molecular y Lipofilidad, fue capaz de identificar los compuestos con alta, media y baja permeabilidad con un 72%, 73% y 71%, respectivamente. Luego se desarrolló un sistema consenso (multiclasificador) basado en Árboles de Clasificación Binarios, los cuales tuvieron una exactitud de la predicción de 78.4/76.1/79.1% de H/M/L para la serie de entrenamiento y de 78.6/71.1/77.6% para la serie de prueba. Finalmente, la regla de 3 propiedades y el multiclasificador fueron validados en una serie de externa de 23 fármacos que fueron ensayados experimentalmente. La regla evidenció ser muy útil para incrementar el diseño de los ensayos y priorizar los ensayos experimentales a los candidatos con alta absorción y los modelos QSPR tuvieron una adecuada capacidad predictiva. Se demostró la utilidad de la combinación de las metodologías computacionales y experimentales para la predicción de la permeabilidad, así como para la realización de cribados virtuales en las etapas iniciales de desarrollo de medicamentos.

3.3 Desarrollo de un nuevo sistema de clasificación biofarmacéutica provisional (PBC) basado en la permeabilidad en células Caco-2 y en el número de dosis.

En este estudio se desarrolló una clasificación provisional (PBC), basada en el BCS, para una base de datos de 322 fármacos orales. Esta clasificación, basada en la solubilidad acuosa (número de dosis) y la permeabilidad aparente en células Caco-2, muestra una alta correlación (>76%) con el sistema de clasificación provisional del BCS publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Luego se desarrollaron modelos QSPR independientes para identificar las clases de permeabilidad y solubilidad del BCS. Los tres mejores modelos para predecir cada propiedad fueron seleccionados y combinados en un sistema de consenso, basado en el mecanismo de voto mayoritario. La validación de este enfoque computacional se llevó a cabo en un grupo de 57 fármacos de la Lista de Medicamentos Esenciales de la OMS. Los modelos computacionales para la predicción del BCS se utilizaron para predecir una base de datos de 679 fármacos orales clasificados por los modelos del BDDCS, y otra de 37 202 compuestos evaluados en ensayos preclínicos y clínicos. Los modelos QSPR ofrecen una nueva herramienta para estimar las clases del BCS para NEMs.

Finalmente, se desarrolló una aproximación computacional para predecir de forma conjunta el BCS y el BDDCS, utilizando de forma independiente, modelos de clasificación para el número de dosis, la permeabilidad en Caco-2 y la extensión del metabolismo. Las predicciones finales permitieron definir un nuevo filtro biofarmacéutico, que se empleó para caracterizar los perfiles de absorción de compuestos similares a fármacos, de fármacos genéricos y para cribar nuevas entidades moleculares.

3.4 Implementación de la nueva estrategia para la clasificación biofarmacéutica de fármacos dentro del desarrollo de medicamentos genéricos.

Se llevó a cabo a través de dos proyectos internacionales: 1- **Montaje de un laboratorio de Química Computacional, con fines académicos y científicos, para el diseño de potenciales candidatos a fármacos, en enfermedades de alto impacto social** (financiado por la AECID) y 2- **Red para el desarrollo de metodologías biofarmacéuticas racionales que incrementen la competencia y el impacto social de las Industrias Farmacéuticas Locales** (financiado por la Comisión Europea). Ambos proyectos permitieron crear los tres laboratorios que conforman la **Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica**: un laboratorio de modelación computacional para la investigación, un aula de modelación para el postgrado y la investigación, y un laboratorio para la experimentación biofarmacéutica. Todo esto se ha aglutinado a una estrategia de formación que incluye una maestría en investigación y desarrollo de medicamentos (2da edición) y el desarrollo de talleres nacionales e internacionales sobre actualización biofarmacéutica.

4- Conclusiones

Se realizaron revisiones bibliográficas sobre el tema de absorción y biodisponibilidad de fármacos, profundizándose sobre el estado del arte de la temática y los principales problemas existentes. Se desarrollaron y validaron experimentalmente un conjunto de herramientas computacionales para obtener una adecuada clasificación de la

permeabilidad en Caco-2 y de la solubilidad, y se combinaron para establecer una clasificación provisional del BCS. Finalmente, la metodología se extendió a la predicción del BDDCS, definiendo ocho criterios biofarmacéuticos para analizar perfiles biofarmacéuticos de fármacos o de Nuevas Entidades Moleculares (NEMs). Toda esta metodología se implementó con la creación de la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica. Tomando en consideración que la industria farmacéutica cubana tiene dentro de su misión **la producción de medicamentos para el mejoramiento de la salud del pueblo y la generación de bienes exportables** y que uno de sus principales programas es el **desarrollo de genéricos y productos farmacéuticos de avanzada**, la presente propuesta pudiera contribuir de forma satisfactoria a su consecución.

Referencias

- [1] G.L. Amidon, H. Lennernas, V.P. Shah, and J.R. Crison. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res.* 12:413-420 (1995).
- [2] C.Y. Wuand L.Z. Benet. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm Res.* 22:11-23 (2005).
- [3] CPMP/EWP/QWP/1401/98. Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence, Evaluation of Medicines for Human Use, Vol. 2008, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), London, 2000.
- [4] S. Yamashita, Y. Tanaka, Y. Endoh, Y. Taki, T. Sakane, T. Nadai, and H. Sezaki. Analysis of drug permeation across Caco-2 monolayer: implication for predicting in vivo drug absorption. *Pharm Res.* 14:486-491 (1997).
- [5] H. van de Waterbeemd. High-throughput and in silico techniques in drug metabolism and pharmacokinetics. *Current opinion in drug discovery & development.* 5:33-43 (2002).
- [6] H.H. Usanskyand P.J. Sinko. Estimating human drug oral absorption kinetics from Caco-2 permeability using an absorption-disposition model: model development and evaluation and derivation of analytical solutions for $k(a)$ and $F(a)$. *J Pharmacol Exp Ther.* 314:391-399 (2005).
- [7] W.J. Westlake. Use of confidence intervals in analysis of comparative bioavailability trials. *J Pharm Sci.* 61:1340-1341 (1972).
- [8] J.S. Kim, S. Mitchell, P. Kijek, Y. Tsume, J. Hilfinger, and G.L. Amidon. The Suitability of an in Situ Perfusion Model for Permeability Determinations: Utility for BCS Class I Biowaiver Requests. *Mol Pharmaceutics.* 3:686-694 (2006).
- [9] K.K. Midhaand G. McKay. Bioequivalence; its history, practice, and future. *AAPS J.* 11:664-670 (2009).
- [10] N.A. Kasim, M. Whitehouse, C. Ramachandran, M. Bermejo Sanz, H. Lennernas, A.S. Hussain, H.E. Junginger, S.A. Stavchansky, K.K. Midha, V.P. Shah, and G. Amidon. Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. *Mol Pharm.* 1:85-96 (2004).
- [11] L.Z. Benet, F. Broccatelli, and T.I. Oprea. BDDCS Applied to Over 900 Drugs. *AAPS J.* 13:519-547 (2011).

[12] T. Hou, J. Wang, W. Zhang, and X. Xu. ADME evaluation in drug discovery. 7. Prediction of oral absorption by correlation and classification. *J Chem Inf Model.* 47:208-218 (2007).

Publicaciones

- ✓ Hai Pham The, Teresa Garrigues, Marival Bermejo, Isabel González-Álvarez, Maikel Cruz-Monteagudo and Miguel Ángel Cabrera Pérez. Provisional Classification and In Silico Study of Biopharmaceutical System based on Caco-2 cell Permeability and Dose number. *Molecular Pharmaceutics*, 10(6), 2445-2461, (2013) . IF: 4.570, JR 30/261 (Q1) *Pharmacology & Pharmacy*.
- ✓ Hai Pham The, Isabel González Álvarez, Marival Bermejo, Teresa Garrigues Pelufo, Huong Le-Thi-Thu and Miguel Ángel Cabrera Pérez. The Use of Rule-based and QSPR approaches in ADME Profiling: A case study on Caco-2 Permeability. *Molecular Informatics*, 32, 459-479, (2013). IF: 2.338, JR 30/59 (Q2) *Medicinal Chemistry*.
- ✓ Cabrera-Pérez MÁ, Pham-The H, Bermejo M, Álvarez IG, Álvarez MG, Garrigues TM. QSPR in oral bioavailability: specificity or integrality? *Mini-Rev Med Chem* 12(6):534-50 (2012). IF: 2.865, JR 21/59 (Q2) *Medicinal Chemistry*.
- ✓ Hai Pham The, Isabel González Álvarez, Marival Bermejo Sanz, Victor Mangas Sanjuan, Inmaculada Centelles, Teresa Garrigues Pelufo and Miguel Ángel Cabrera Pérez. In-silico prediction of Caco-2 cell permeability by a classification QSAR approach. *Molecular Informatics*, 30(4): 376-385, (2011). IF: 2.338, JR 30/59 (Q2) *Medicinal Chemistry*.
- ✓ Miguel Ángel Cabrera Pérez and Isabel González Álvarez. Computational and Pharmacoinformatic Approaches to Oral Bioavailability Prediction (chapter 33). *Oral Bioavailability: Basic Principles, Advanced Concepts, and Applications*, 538 páginas, ISBN: 978-0-470-26099-9, (2011).