

Corrélation structure-liaison à la sérum albumine dans une série d'amides crésotiniques

M. Audran *, J.L. Chanal *, G. Berge ** et R. Maignan *

* *Laboratoire de Physique et Biophysique, et ** Laboratoire de Chimie Pharmaceutique, Faculté de Pharmacie, Avenue Charles Flahault, Montpellier (France)*

(Reçu le 27 juillet 1982)

(Version modifié reçu le 15 décembre 1982)

(Accepté le 20 décembre 1982)

Summary

The in vitro study of the bovine serum albumin binding of cresotinamid and six of its analogs, all labelled with carbon-14, was performed by the method of equilibrium dialysis. The binding parameters, association constants and number of sites were determined. Characteristic physicochemical parameters of these components' structure, lipophilia, pK_a , steric volume were calculated and correlations could be established between these physicochemical parameters, especially lipophilia and the binding parameters.

Résumé

L'étude de la liaison in vitro à la sérum albumine bovine de la crésotinamide et de six de ses dérivés, tous marqués au ^{14}C , a été réalisée par la méthode d'équilibre de dialyse. Les paramètres de liaison, constantes d'association et nombre de sites, ont été déterminés. Des paramètres physicochimiques caractéristiques de la structure de ces composés, lipophilie, pK_a , encombrement stérique, ont été calculés et des corrélations ont pu être établies entre ces paramètres physicochimiques, notamment la lipophilie, et les paramètres de liaison.

Introduction

L'interaction entre un médicament et les protéines, sériques ou tissulaires, influence souvent son activité biologique, non seulement parce qu'une telle association

est nécessaire pour que les interactions médicaments–sites récepteurs se produisent, mais également parce qu'elle peut—dans certains cas—jouer un rôle dans l'absorption, la distribution et l'élimination de ce médicament.

Différentes études ont été menées (Hanch et al., 1965; Hanch, 1971; Hanch et Silipot, 1974; Patel et al., 1968; Helmer et al., 1968; Krieglstein et al., 1972; Chien et al., 1975, 1976; Sanvordeker, 1975) pour déterminer la nature physicochimique des forces de liaison médicament–protéine. Des corrélations ont été trouvées entre des paramètres physicochimiques tels que la liposolubilité, le pK_a ou la densité de charge électronique et la force de liaison du médicament à la sérum albumine.

Nous avons, dans cette voie, entrepris l'étude de la liaison à la sérum albumine bovine de la crésotinamide et de 6 de ses dérivés (Tableau 1), et calculé leurs paramètres de liaison. Nous avons déterminé quels sont, parmi les paramètres, les plus représentatifs de la structure à savoir lipophilie, pK_a et encombrement stérique du substituant sur la fonction amide, ceux qui sont impliqués dans la liaison à la BSA.

Matériel et Méthodes

Synthèse des composés

Les sept composés étudiés ont été synthétisés par le laboratoire Pierre Fabre. Tous ces composés ont été marqués au ^{14}C sur le radical carboxyle.

Les microsynthèses ont comme point de départ l'acide 2–3 crésotinique ^{14}C carboxyle fourni par le CEA.

Le contrôle de la pureté de ces composés a été effectué par chromatographie en couche mince sur gel de silice (Merck F254) dans quatre types de solvants.

Tous les composés avaient, après recristallisation, une pureté radiochimique supérieure à 99%.

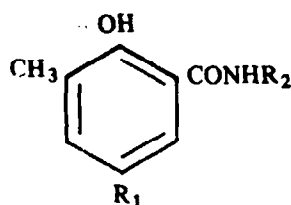
Etude de la liaison

L'albumine utilisée était la BSA fraction V, pulvérisée, Fluka A.G. (pH en solution aqueuse 1%, approximativement 7).

La liaison a été étudiée par la méthode d'équilibre de dialyse. Les solutions de ligand et de protéine sont effectuées dans un tampon phosphate de pH 7,4. Le tube à dialyse est une membrane de cellulose Visking (20/32) dont le diamètre moyen des pores est de 24 μm . Ce tube est découpé en morceaux de longueur déterminée et qui sont immergés pendant 24 h dans une solution de tampon phosphate pH 7,4, puis rincés à l'eau distillée et essorés avant leur utilisation.

L'équilibre de dialyse est réalisée à 4°C. Lorsqu'il est atteint, la concentration en ligand dans chacun des compartiments est mesurée par scintillation liquide. La mesure de radioactivité dans le compartiment contenant la protéine donne la concentration totale en médicament CT, la mesure de la radioactivité dans le compartiment extérieur la concentration en médicament libre Cl.

TABLEAU I



Composé	R1	R2	Nom
1	-H	-H	crésotinamide
2	-Br	-H	N-bromocrésotinamide
3	-Br	-CH ₃	N-méthyl bromocrésotinamide
4	-Br	-CH ₂ CH ₃	N-éthyl bromocrésotinamide
5	-Br	-CH $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \\ \text{CH}_2 \end{matrix}$	N-isopropyl bromocrésotinamide
6	-Br	-CH ₂ $\begin{matrix} \text{CH}_2 \\ \text{CH}_2 \end{matrix}$	N-cyclopropyl bromocrésotinamide
7	-BR	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	N-butyl bromocrésotinamide

Détermination des paramètres physicochimiques

Le paramètre hydrophobe le plus couramment utilisé est le coefficient de partage. C'est donc celui-ci que nous avons choisi.

Il a été effectué dans le système *n*-octanol-eau acidifiée par HCl (pH 1) afin de maintenir les composés sous leur forme phenol et déterminé par comptage en scintillation liquide.

Nous avons utilisé le paramètre MR pour traduire l'encombrement stérique du substituant porté par la fonction amide. Les différentes valeurs de ce paramètre sont celles données par Hansch et Silipot (1974).

Le caractère électronique des molécules a été exprimé par le pK_a . Les composés étudiés étant très peu solubles dans l'eau, nous avons effectué les mesures des pK_a dans des systèmes eau-éthanol dont on faisait varier les proportions de façon à obtenir la valeur du pK_a à différentes valeurs de $1/\epsilon$, ϵ étant la constante diélectrique du milieu. A partir des différentes valeurs de pK_a et de $1/\epsilon$ correspondant, nous avons pu établir des relations linéaires $pK_a = f(1/\epsilon)$.

Toutes les mesures ont été réalisées à 25°C. Les titrages ont été effectués avec de la soude 0.1 N à l'aide d'un enregistreur de titrage automatique (Taccusel type titrimat). Les valeurs de pK_a ont été calculées sur les courbes potentiométriques à la demi-neutralisation de même que la valeur de $1/\epsilon$ correspondant:

$$\frac{1}{\epsilon_{1,2}} = \frac{V_{\text{eau}} + V_{\text{ethanol}}}{80 V_{\text{eau}} + 24.3 V_{\text{ethanol}}}$$

avec V_{eau} = volume d'eau initial = volume de soude ajouté pour atteindre la demi

neutralisation; et $V_{\text{éthanol}}$ = volume d'éthanol utilisé.

En portant la valeur $1/\epsilon = 1/80$ dans l'équation $pK_a = f(1/\epsilon)$ on obtient la valeur du pK_a que l'on aurait eu dans l'eau pure.

Résultats et Discussion

Nous avons, pour déterminer les paramètres de liaison, tracé les isothermes de liaisons selon la représentation proposée par Scatchard (1949).

Celles obtenues pour la crésotinamide et sa dérivé N-bromo (Figs. 1 et 2) sont linéaires sur l'intervalle de concentration en ligand étudié, mettant ainsi en évidence l'existence d'une seule catégorie de sites.

Les isothermes de liaison des autres composés ne sont pas linéaires (Figs. 3-7). Nous avons dans ce cas retenu l'hypothèse de l'existence sur la protéine de deux catégories de sites de liaison indépendants, une dite de 'sites forts' et une de 'sites faibles', et déterminé les paramètres de liaison n et K par la méthode graphique de Rosenthal (1967).

Les valeurs des paramètres de liaison des 'sites forts' sont présentés dans le Tableau 2.

Les valeurs des paramètres physicochimiques pK_a , $\log P$, MR sont rassemblés dans le Tableau 3.

L'établissement des équations entre paramètres physicochimiques et la liaison à la sérum albumine a été fait à partir d'une analyse régressive à étapes successives en utilisant l'approche de Hansch (1971).

Nous avons envisagé les cas où la liaison était exprimée par $\log K_1$ puis celui où

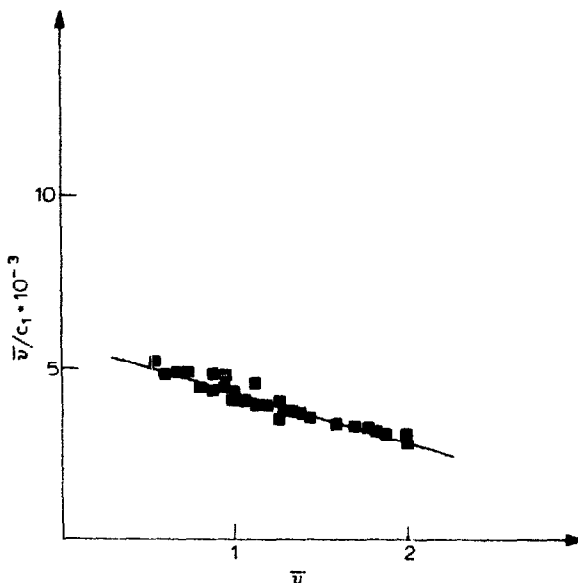


Fig. 1. Isotherme de liaison de la crésotinamide.

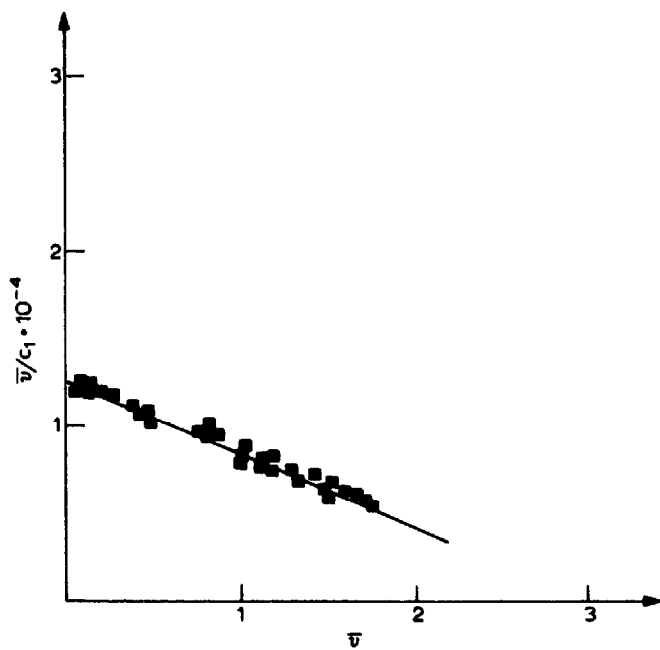


Fig. 2. Isotherme de liaison de la N-bromocrésotinamide.

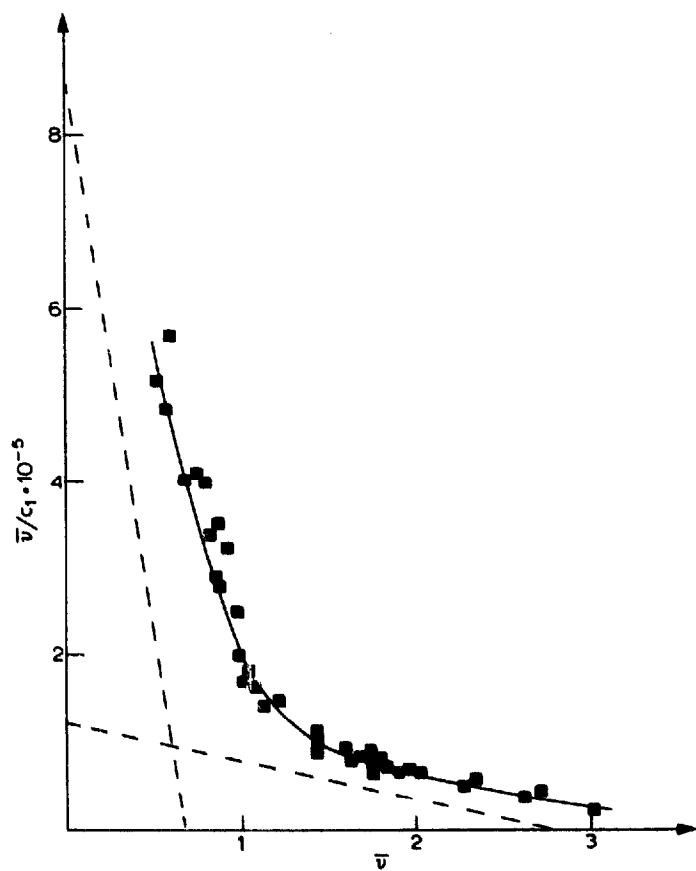


Fig. 3. Isotherme de liaison de la N-méthyl bromocrésotinamide.

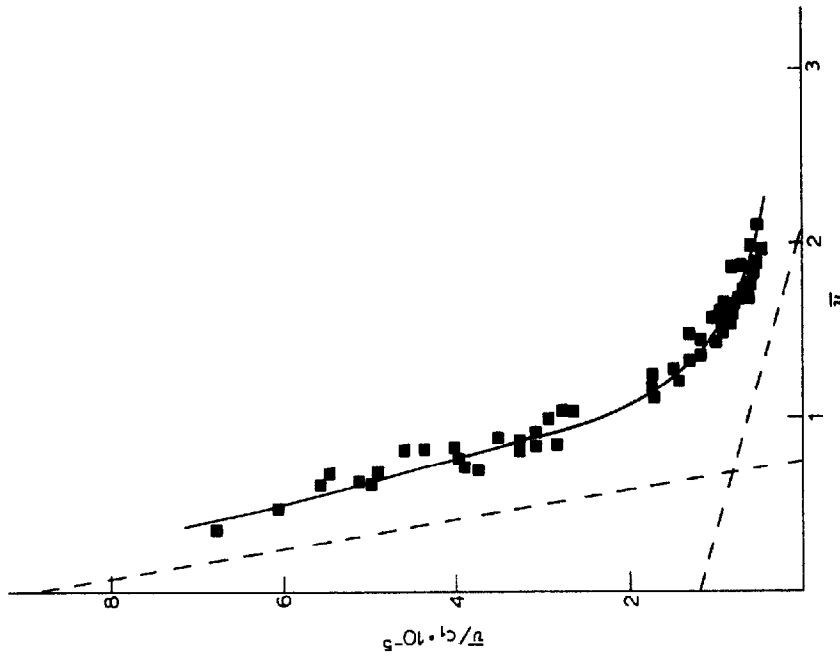


Fig. 5. Isotherme de liaison de la N-isopropyl bromocrésotinamide.

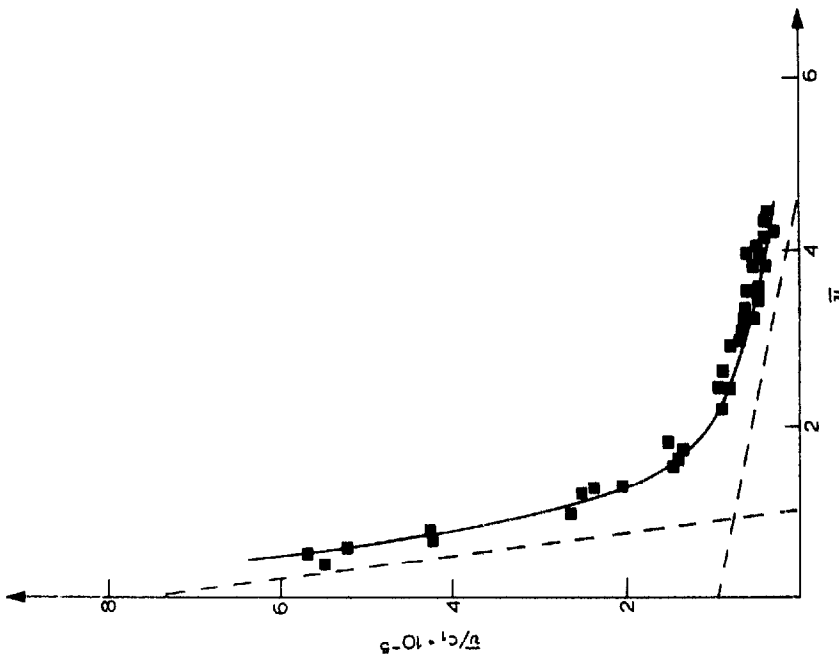


Fig. 4. Isotherme de liaison de la N-éthyl bromocrésotinamide.

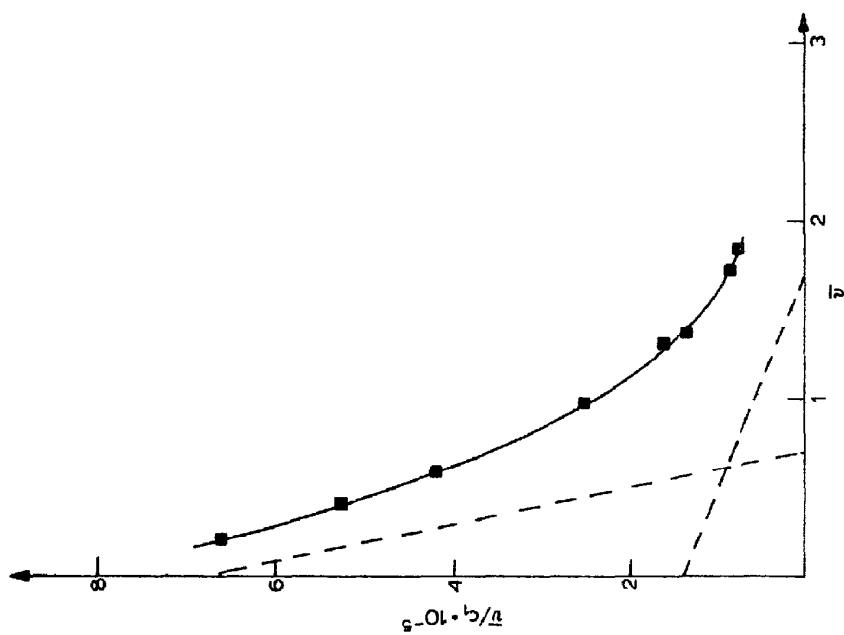


Fig. 7. Isotherme de liaison de la N-butyl bromocrésotinamide.

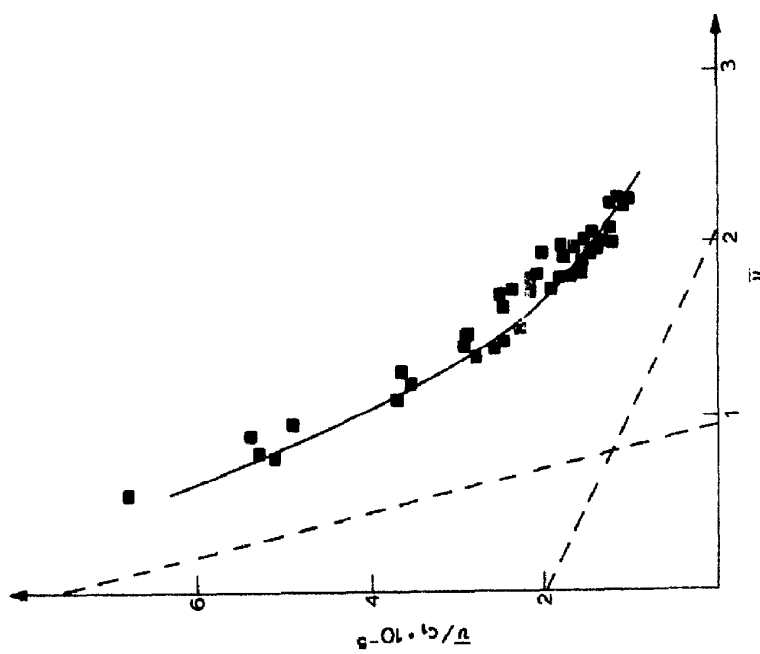


Fig. 6. Isotherme de liaison de la N-cyclopropyl bromocrésotinamide.

TABLEAU 2

Composé	K_1 ($l \cdot mol^{-1}$)	n_1	$\log K_1$	$\log K_1 n_1$
1	1.45×10^3	4	3.16	3.76
2	5.00×10^4	3	4.70	5.18
3	1.22×10^6	0.70	6.09	5.93
4	7.75×10^5	1	5.89	5.89
5	9.30×10^5	0.75	5.97	5.95
6	8.00×10^5	0.95	5.90	5.88
7	9.31×10^5	0.72	5.97	5.83

TABLEAU 3

Composé	pK_a	$\log P$	MR
1	8.48	2.12	1.03
2	7.58	2.76	1.03
3	7.52	3.51	5.65
4	7.53	3.61	10.30
5	7.54	4.19	14.96
6	7.39	3.80	13.53
7	7.57	4.21	19.59

elle était exprimée par $\log K_1 n_1$ de façon à savoir si l'introduction du nombre de sites dans le paramètre de liaison pouvait améliorer les relations.

Le paramètre physicochimique le mieux relié à la liaison est pK_a , mais étant donné l'importance du composé no. 1 dans l'établissement des équations entre $\log K_1$ ou $\log K_1 n_1$ et pK_a , ces équations n'ont pas été retenues.

Des corrélations significatives ont été établies entre ces paramètres de liaison et le coefficient de partage. (Figs. 8 et 9).

$$\log K_1 = 1.310(\pm 0.636) \log P + 0.854(\pm 2.246) \quad (1)$$

$$n = 7; r = 0.92; r^2 = 0.85; s = 0.465; F'_5 = 28.00(\alpha < 0.01)$$

$$\log K_1 n_1 = 0.949(\pm 0.532) \log P + 2.209(\pm 1.876) \quad (2)$$

$$n = 7; r = 0.81; r^2 = 0.81; s = 0.388; F'_5 = 21.04(\alpha < 0.01)$$

Des équations de type parabolique en $\log P$, $(\log P)^2$ se sont avérées plus satisfaisantes du point de vue statistique:

$$\log K_1 = 6.921(\pm 2.171) \log P - 0.879(\pm 0.338)(\log P)^2 - 7.598(\pm 3.335) \quad (3)$$

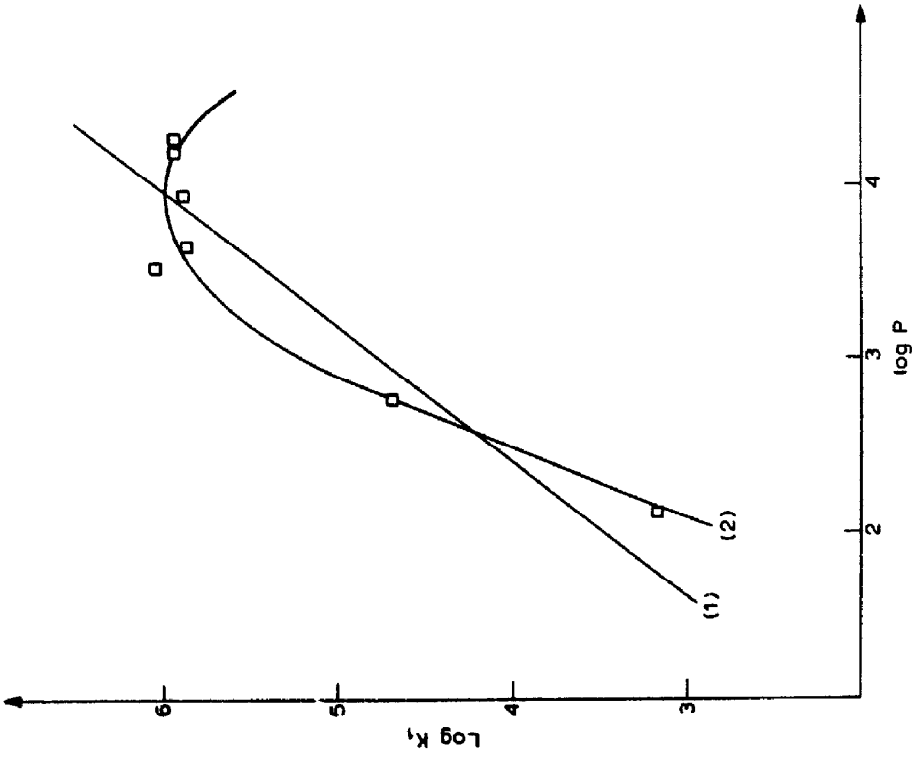


Fig. 8. Equation 1 (1); equation 2 (2).

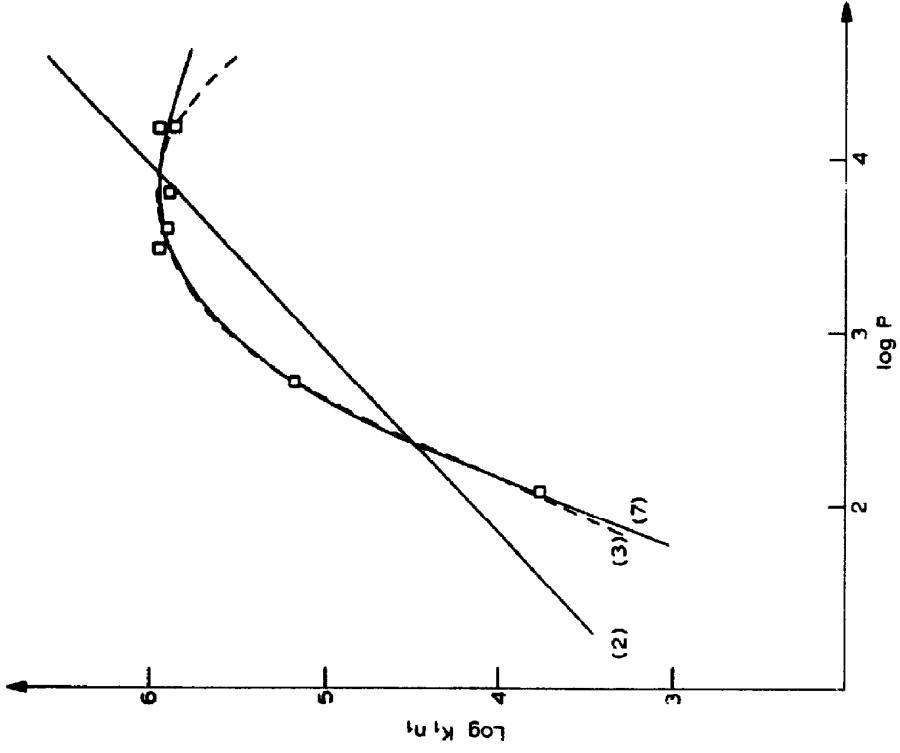


Fig. 9. Equation 2 (2); equation 3 (3); equation 7 (7).

$$n = 7; r = 0.995; r^2 = 0.989; s = 0.139; F_4^2 = 182.62 (\alpha < 0.001); \log P_0 = 3.94$$

$$\log K_{1,n_1} = 5.738 (\pm 1.185) \log P - 0.750 (\pm 0.185) (\log P)^2 - 5.005 (\pm 1.820) \quad (4)$$

$$n = 7; r = 0.997; r^2 = 0.994; s = 0.076; F_4^2 = 339.19 (\alpha < 0.001); \log P_0 = 3.82$$

De telles équations ont été présentées dans la littérature, Dunn (1973) et Lecek et Coutinho (1976), mais leur signification reste vague.

Les relations linéaires en fonction de $\log P$ (éqns. 1 et 2) peuvent également, mais à un degré moindre, être améliorées par l'introduction du paramètre MR, paramètre qui tient compte de l'encombrement stérique en ortho de la fonction phénol.

$$\log K_1 = 2.350 (\pm 1.103) \log P - 0.122 (\pm 0.118) MR - 1.593 (\pm 2.843) \quad (5)$$

$$n = 7; r = 0.973; r^2 = 0.947; s = 0.229; F_4^2 = 35.48 (\alpha < 0.01)$$

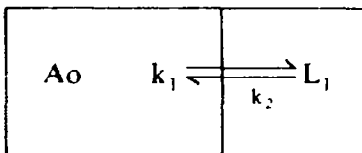
$$\log K_{1,n_1} = 1.850 (\pm 0.847) \log P - 0.105 (\pm 0.091) MR + 0.088 (\pm 2.182)$$

$$n = 7; r = 0.973; r^2 = 0.947; s = 0.229; F_4^2 = 35.48 (\alpha < 0.01)$$

Ces équations semblent mettre en évidence l'effet défavorable de l'encombrement stérique dans le processus de liaison. Mais ce paramètre MR est très redondant avec la lipophilie (84.9%) et ceci peut rendre discutable sa signification.

Les équations de type paraboliques, statistiquement les meilleures, nous ont conduit à examiner si la corrélation entre liaison et coefficient de partage ne pouvait pas être mieux exprimée par une approche faisant appel à un système bilinéaire et décrite par Kubiniy (1978).

Effectivement dans le cas particulier de l'étude, in vitro, relative à la liaison à la BSA des amides crésotiniques on peut envisager le modèle suivant à deux compartiments:



A_o étant le milieu aqueux tamponné à pH 7,4, L₁ étant la protéine.

La probabilité de présence sur la protéine peut s'inscrire:

$$\text{Pr } 0.1 = \frac{k_1}{k_1 + k_2} \text{ or } \frac{k_1}{k_2} = \frac{V_p C_p}{V_A C_A} = \beta P$$

$$\text{Pr } 0.1 = \frac{k_1/k_2}{k_1/k_2 + 1} = \frac{\beta P}{\beta P + 1}$$

ou encore $\log \text{Pr } 0.1 = \log \beta + \log P - \log(\beta P + 1)$

soit $\log \text{Pr } 0.1 = \log P - \log(\beta P + 1) + \text{Cte}$

en ce rapportant à la concentration initiale:

$$\log 1/C = \delta \log P - \delta \log(\beta P + 1) + \text{Cte}$$

Cette équation est une équation bilinéaire dont les pentes sont respectivement δ et $\delta \delta = 0$.

Les calculs réalisés sur la base du modèle bilinéaire conduisent à l'équation suivante:

$$\log K_1 n_1 = 3.245(\pm 0.536) \log P - 3.607(\pm 0.825) \log(\beta P + 1) - 2.862(\pm 1.218) \quad (7)$$

$n = 7$; $r = 0.999$; $r^2 = 0.997$; $s = 0.062$; $F_2^3 = 340.21(\alpha < 0.001)$; $\log \beta = -2.865$;

$$\log P_0 = 3.82$$

Cette équation est non symétrique (Fig. 9). La pente de la partie ascendante est 3.245 celle de la partie descendante — 0.362.

Ce modèle de type bilinéaire semble être le mieux approprié à expliquer la nature de la liaison à la sérum albumine bovine de ces 7 amides crésotiniques, et le paramètre lipophile apparaît comme étant le paramètre prépondérant dans ce type de liaison.

Remerciements

Nous remercions tout particulièrement Messieurs H. Cousse et B. Bonnaud qui ont réalisé la synthèse de toutes les molécules marquées.

Bibliographie

- Chien, Y.W., Lambert, H.J. et Lin, T.K., Linear relationships between plasma binding and lipophilicity of disopyramide derivatives. *J. Pharm. Sci.*, 64 (1975) 961-965.
- Chien, Y.W., Hofmann, L.M., Lambert, H.J. et Tao, L.C., Binding of spiroactones to human plasma proteins. *J. Pharm. Sci.*, 65 (1976) 1337-1340.
- Dunn, W., Specificity of binding to human serum albumin. *J. Pharm. Sci.*, 62 (1973) 1575-1577.
- Fujita, T., Hydrophobic bonding of sulfonamide drugs with serum albumin. *J. Med. Chem.*, 15 (1972) 1049-1056.
- Hansch, C., Kiehs, K. et Lawrence, G.L., The role of substituents in the hydrophobic bonding of phenols by serum and mitochondrial proteins. *Am. Chem. Soc.*, 87 (1965) 5770-5773.
- Hansch, C., Quantitative structure activity relationships. In Ariens, E.I. (Ed.), *Drug Dosing*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1971, pp. 271-333.

- Hansch, C., Leo, A., Ungers, K.K.H., Nikaitani, D.L., Aromatic substituent constants for structure activity correlations. *J. Med. Chem.*, 16 (1973) 1207-1216.
- Hansch, C. et Silipot, C., Quantitative structure-activity relationships of reversible dihydrofolate reductase inhibitors. *J. Med. Chem.*, 17 (1974) 661-672.
- Helmer, F., Kiehs, K. et Hansch, C., The linear free energy relationship between partition coefficients and the binding and conformational perturbation of macromolecules by small organic compounds. *Biochemistry*, 7 (1968) 2858-2863.
- Krieglstein, J., Lier, F. et Michaelis, J., Albumin binding and hydrophobic character of promazine and chlorpromazine metabolites. *Arch. Pharmacol*, 272 (1972) 121-130.
- Kubiniy, H., Drug partitioning: relationships between forward and reverse rate constants and partition coefficient. *J. Pharm. Sci.*, 67 (1978) 262.
- Lecek, R.W. et Coutinho C.B. The role of substituents in the hydrophobic binding of the 1,4-benzodiazepines by human plasma proteins. *Mol. Pharmacol.*, 12 (1976) 612-619.
- Patel, N.K., Sheen, P.C. et Taylor, K.E., Studies on protein binding I. Interaction of para-hydroxybenzoic acid esters with bovine serum albumin. *J. Pharm. Sci.*, 57 (1968) 1370-1375.
- Rosenthal, H.E., A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system. *Anal. Biochem.*, 20 (1967) 525-532.
- Sanvordeker, D.R., Chien, Y.W., Lin, T.K. et Lambert H.J., Binding of metronidazole and its derivatives to plasma proteins: an assessment of drug binding phenomenon. *J. Pharm. Sci.*, 64 (1975) 1797-1803.
- Scatchard, G., The attraction of proteins for small ions and molecules. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51 (1949) 660-672.