
MODIFICACIONS EN LA UNIÓ DE LA GLIPENTIDA A COMPONENTS HEMÀTICS PER EFECTE D'ALTRES MEDICAMENTS *

R. LÓPEZ, V. RIMBAU, A. TORRALBA

És evident que la unió d'un medicament a les estructures proteiques dels receptors té una gran importància per a l'activitat farmacològica del producte. Nogensmenys, cal no oblidar que les interaccions medicament-proteïna poden tenir lloc amb un gran nombre de proteïnes, cosa que regula l'absorció, distribució, metabolisme i excreció del medicament. És per això que a l'estudi de l'enllaç se li dona actualment una importància creixent, ja que a llarg terme permetrà uns millors coneixement i predicció dels efectes terapèutics i tòxics dels medicaments.

La unió a l'albumina sèrica és una de les més estudiades. Això és degut a que l'albumina és una proteïna perfectament caracteritzada i que juga un important paper com a transportador i reservori, modulant la disponibilitat de producte a nivell de receptor, sobretot si la força d'unio és forta.

L'albumina sèrica és el major component hemàtic captador de medicament; però si l'estudi es fa amb una dissolució de la proteïna pura en tampó, es poden obtenir uns resultats bastant allunyats de la realitat biològica. Això és lògic si pensem en la més gran capacitat de solvació de la sang i en la presència *in vivo* de molts compostos endògens i exògens que augmenten la competència pels llocs d'unio. El coneixement d'aquests factors ens explicarà probablement les relativament freqüents pobres correlacions entre nivells hemàtics i eficàcia terapèutica. La importància de tot això no és estranya ja que, segons BENNHOLD, 5 litres de sang contenen proteïnes amb una superfície mínima de 336.700 Km^2 .¹

A la figura 1 presentem un esquema de l'enllaç d'uns quants productes als components hemàtics.

* Sessió del dia 30 de gener de 1979.

L'albumina, en ser la principal proteïna plasmàtica (50 % del total), és la major responsable de la unió. D'altra banda, no és la quantitat l'única raó de la seva importància. L'albumina, en dissolució, es pot trobar en un gran nombre de complexos energèticament equivalents, cosa que encara incrementa més la quantitat de llocs d'unió potencial en modificar l'estructura terciària de la proteïna. Tant és així, que s'ha suggerit que una de les principals funcions de l'albumina pot ser la de transport de materials endògens.¹ Per exemple, els àcids grassos i la bilirubina.

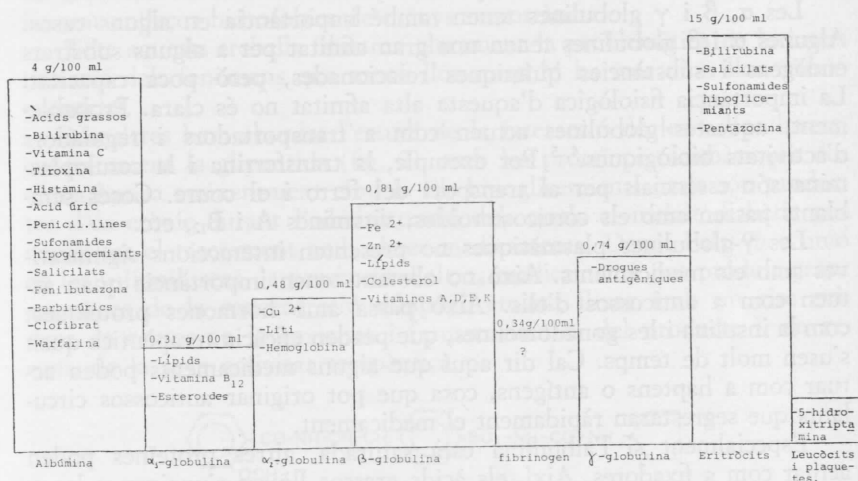


FIG. 1. — Concentracions dels principals components hemàtics i lligament de fàrmacs.

L'albumina de la sang, que representa el 30-40 % de la total del cos, és activament intercanviada amb la dels altres fluids orgànics. Així, de la quantitat d'albumina intravascular (140 g per a un home de 75 Kg), un 10 % o més passa cada hora al líquid intersticial, del qual retorna via sistema limfàtic.

Es pot esperar, per tant, que disminucions en els nivells normals d'albumina, tal com passa en la infància, embaràs i senilitat, malalties com nefrosi, hepatitis, cirròsi, càncers, hipergammaglobulinèmies, mala nutrició, etc., o per *stress*, traumatismes, alcohol, Cl₄C, etc., produeixin en medicaments que serien captats, augments significatius de medicament lliure. Això pot produir increments de l'activitat terapèutica i/o dels efectes tòxics que no trobaríem si s'hagués donat la mateixa dosi a un adult sa.

Ultra els baixos nivells d'albumina, el complex pot també estar disminuït per la presència de metabòlits endògens circulants. Això passa amb la bilirubina i els àcids grassos o en presència d'altres medicaments.² Així, persones amb icterícia o amb dieta lipídica elevada presenten una capacitat d'unió a les drogues aniòniques, com les sulfonamides i els salicilats, disminuïda. En la fallada renal, productes com l'aspirina, àcid salicílic, fenilbutazona, difenilhidantoïna, tiopental, etc., no estan tan units. Tanmateix aquestes disminucions no es poden explicar completament per les disminucions en la concentració d'albumina, malgrat que s'ha demostrat que aquests productes no s'uneixen significativament a les altres proteïnes plasmàtiques.³

Les α , β i γ globulines tenen també importància en alguns casos. Algunes α i β globulines tenen una gran afinitat per a alguns substrats endògens i substàncies químiques relacionades, però poca capacitat. La importància fisiològica d'aquesta alta afinitat no és clara. Probablement, aquestes globulines actuen com a transportadors i reguladors d'activitats biològiques.^{4, 5} Per exemple, la transferrina i la ceruloplasmina són essencials per al transport del ferro i el coure. Coses semblants passen amb els corticosteroides, vitamines A i B₁₂, etc.

Les γ -globulines plasmàtiques no presenten interaccions significatives amb els medicaments. Això no obstant tenen importància quan actuen com a anticossos d'ells. Això passa amb hormones proteïques, com la insulina i les gonadotrofines, que perden eficàcia terapèutica quan s'usen molt de temps. Cal dir aquí que alguns medicaments poden actuar com a haptens o antígens, cosa que pot originar anticossos circulants que segrestaran ràpidament el medicament.

Especialment si l'albumina està saturada, altres proteïnes poden actuar com a fixadores. Així, els àcids grassos lliures s'uneixen a les α i β -lipoproteïnes,⁶ la bilirubina,⁷ tetrahidrocannabinol i metabòlits,^{8, 9} etc. Las sulfonilurees també poden unir-se si els llocs d'unió a l'albumina se saturen.¹⁰

El tipus d'unió de les sulfonamides a l'albumina planteja també interessants qüestions. Mentre els treballs de CLAUSEN,¹¹ FUJITA i HANSCH¹² i SCHOLTAN¹³ sostenen que les forces hidrofòbiques són les que aporten la major energia de la interacció sulfonamida-proteïna, KLOTZ i WALKER¹⁴ i NAKAGAKI¹⁵ evidencien l'important paper de les interaccions entre l'anió sulfonamida i la càrrega positiva de la superfície proteica. MORIGUCHI¹⁶ va trobar una bona correlació entre el pK_a del nitrogen sulfamídic de 19 sulfonamides i l'enllaçament, la qual cosa explicaria un domini de les forces electrostàtiques. Això estava d'acord amb les conclusions del treball de NAKAGAKI¹⁵ que investigava l'enllaç de 6 sulfonilurees a l'albumina sèrica bovina a diferents pH. Tanmateix, NAKAGAKI no va considerar el caràcter hidrofòbic de les sulfonamides i FUJITA,¹⁷ en reexaminar les dades, va veure que aquesta

hidrofobicitat té una gran importància per a la interacció de la molècula neutra amb la fracció hidrofòbica de la superfície proteica. AGREEN i colls.¹⁸ van demostrar una relació directa entre lipofilicitat i unió de 26 sulfonamides a l'albumina sèrica humana. La correlació, però, va ser molt millor entre unió i distribució electrònica mitjançant el mètode de Hückel. Així pogué deduir que el major determinant de la unió és l'atracció electrostàtica entre la part aniònica de la substància i el lloc primari d'unió a l'albumina sèrica humana (consistent en una seqüència d'aminoàcids contenint lisina i arginina carregades positivament). Un segon paper pogué atribuir-se a l'atracció entre els residus de triptòfan en l'albumina i l'àtom en part del nucli sulfamídic, mitjançant enllaços hidrofòbics de menys importància.

Tots aquests treballs il·lustren clarament la problemàtica de la interpretació dels fenòmens que tenen lloc quan hi ha més d'un lloc d'unió potencial.

Nosaltres hem abordat l'estudi de la interacció de les sulfonilurees, concretament la glipentida (fig. 2), amb les proteïnes plasmàtiques des d'una òptica eminentment clínica. Els hipoglicèmians orals són productes d'ús crònic durant l'administració dels quals el malalt diabètic pot necessitar el tractament amb altres medicaments. Donat l'alt % d'unió de les sulfonilurees, la presència d'altres medicaments pot produir grans augmentos de la concentració d'hipoglicèmiat lliure amb un risc evident de canvis en la toxicitat i farmacocinètica del producte i, en resum, de la seva activitat terapèutica.

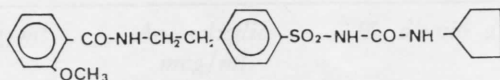


FIG. 2. — Estructura de la glipentida.

Hem fet els estudis utilitzant la glipentida a les concentracions plasmàtiques normals en l'ús clínic del producte,^{19, 20} amb la finalitat que els resultats siguin representatius del que pot passar *in vivo* en condicions similars. Atès que la glipentida és una sulfonilurea del grup de les de gran potència, les dosis a les quals s'administra són molt petites, cosa que ens ha obligat a utilitzar tècniques radioactives de determinació per a tenir prou sensibilitat. Hem usat glipentida marcada amb C-14 en el carbonil ureic.

Les tècniques de separació del producte lligat i no lligat han estat:

- Filtració molecular (Millipore SPED)
- Filtració en gel (Sephadex G-25 medium)
- Precipitació (Tricloracètic 2N)
- Centrifugació (Eritròcits)

La figura 3 mostra el resultat de l'estudi del complex de la glipentida a les proteïnes sèriques pel mètode de la filtració en gel. Com podeu veure, la corba d'elució presenta un pic agut originat per la fracció unida. Contràriament, no apareix el pic que hauria de donar la part lliure. Això és perquè, com que al ser tan petita aquesta fracció, ni les tècniques radioactives de determinació poden detectar-la com a conseqüència de la dilució que implica el mètode. Per aquesta raó, els resultats que presentarem a continuació s'han obtingut pels altres sistemes, especialment per filtració molecular.

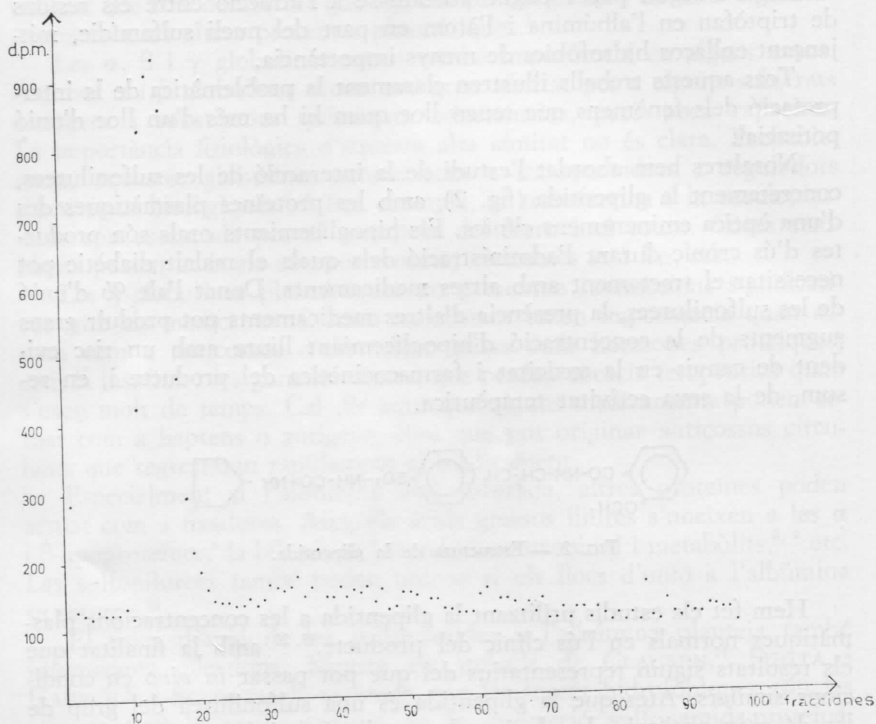


FIG. 3. — Elució de la glipentida- ^{14}C (60 g/ml) per filtració en gel de Sephadex G-25 medium.

En la figura 4 podeu veure els % d'unió de la glipentida a les proteïnes del sèrum i del plasma. L'enllaç a eritròcits, com podeu veure, és significativament més petit. Cal remarcar que la unió a eritròcits, quan la glipentida s'ha afegit a sang total és bastant més baixa del complex trobat amb els eritròcits en suspensió en sèrum fisiològic.

FIG. 4. — Percentatge d'unió de la glipentida (60 $\mu\text{g/ml}$) a diferents fraccions hemàtiques humanes.

Fracció hemàtica	% d'unió de la glipentida
Sèrum	95,74 \pm 0,55
Plasma	94,52 \pm 0,78
<i>Eritròcits</i>	
Suspensió en sèrum fisiològic	23,86 \pm 0,36
Suspensió en sang total	4,27 \pm 3,13

Aquestes dades ens diuen que en sang total gairebé tota la glipentida està lligada a les proteïnes plasmàtiques i que no hi han diferències significatives entre els valors en sèrum i en plasma.

Veieu, a la figura 5, l'efecte de concentracions creixents d'àcid salicílic sobre el lligament de la glipentida. A concentracions terapèutiques, no es produeixen variacions en el % d'unió de la glipentida amb les proteïnes sèriques.

FIG. 5. — Efecte de concentracions creixents d'àcid salicílic sobre el lligament de la glipentida a les proteïnes sèriques.

Glipentida ng/ml	Ac. salicílic mcg/ml	% d'unió de la glipentida
60	16	96,20 \pm 0,91
60	40	95,15 \pm 0,85
60	160	95,39 \pm 0,63
60	400	90,93 \pm 0,96

Això pot ser conseqüència d'una major energia d'unió de la glipentida o a fer-se la unió d'ambdós productes en llocs diferents. Per a aclarir l'importància quantitativa de les dues possibilitats calen futurs estudis de tipus termodinàmic i químic-físic.

Tanmateix es pot dir que l'energia d'enllaç de la glipentida deu ser molt intensa, ja que el complex trobat per un mètode tan dràstic com el de la precipitació dona valors tan alts com un 65 %.

A concentracions tòxiques d'aspirina, la unió de la glipentida és una mica més petita, però quantitativament d'escassa transcendència.

La figura 6, presenta l'efecte que sobre l'enllaçament de glipentida té l'ordre d'incubació. Com podeu veure, la incubació en primer lloc de l'àcid salicílic, a concentracions terapèutiques, no bloqueja la unió de la glipentida.

FIG. 6. — Efecte de l'ordre d'incubació sobre la unió de la glipentida a proteïnes sèriques humanes.

<i>Primer producte incubat</i>	<i>Segon producte incubat</i>	<i>% d'unió de la glipentida</i>
Glipentida 60 µg/ml	Àcid salicílic 16 mcg/ml	96,20 ± 0,91
Àcid salicílic 16 mcg/ml	Glipentida 60 µg/ml	96,02 ± 0,66
Glipentida 60 µg/ml	Àcid salicílic 40 mcg/ml	95,15 ± 0,85
Àcid salicílic 40 mcg/ml	Glipentida 60 µg/ml	95,76 ± 0,74

A la figura 7, podeu veure els resultats de l'estudi de la interacció de la glipentida amb diferents medicaments antiinflamatoris. Ni l'aspirina, ni la indometacina ni la fenilbutazona modifiquen la unió, qualsevol que sigui l'ordre d'incubació.

Els mecanismes implicats en la disminució de la glicèmia per acció de les sulfonilurees són molt nombrosos i no gaire ben coneguts. Tanmateix, es pot dir que els més importants, sobretot en estats diabètics, són els extrapancreàtics.²¹ Nosaltres hem trobat, en diabètics humans, baixades de la glicèmia, lentes i sostingudes, amb uns nivells nuls d'insulina.²²

Conseqüentment, podem esperar que no es produiran accidents hipoglicèmics en la utilització clínica de la glipentida, per desplaçament o bloqueig de la seva unió a les proteïnes hemàtiques, si simultàniament s'administren productes com els estudiats.

D'haver-hi alguna interacció hauria de tenir lloc a un altre nivell; es pot descartar també les de tipus farmacocinètic o distribució a la vista de les petites modificacions en els percentatges d'unió a les proteïnes hemàtiques.

FIG. 7. — Efecte d'alguns antiinflamatoris sobre la unió de la glipentida a les proteïnes sèriques humanes.

Primer producte incubat	Segon producte incubat	% d'unió de la glipentida
Glipentida 60 µg/ml	Àcid acetilsalicílic 40 mcg/ml	96,26 ± 0,58
Àcid acetilsalicílic 40 mcg/ml	Glipentida 60 µg/ml	94,77 ± 0,65
Glipentida 60 µg/ml	Indometacina 1 mcg/ml	96,46 ± 0,78
Indometacina 1 mcg/ml	Glipentida 60 µg/ml	95,04 ± 0,78
Glipentida 60 µg/ml	Fenilbutazona 100 mcg/ml	96,17 ± 0,33
Fenilbutazona 100 mcg/ml	Glipentida 60 µg/ml	95,71 ± 0,33

BIBLIOGRAFIA

- BENNHOLD, H.: Transport function of plasma proteins, p. 1-12. P. Desgrez i P. M. De Traverse, eds., Elsevier, Amsterdam (1966).
- PRUITT, A. W., DAYTON, P. G.: Eur. J. Clin. Pharmacol., núm. 4, p. 59 (1971).
- ANDREASEN, F.: Acta Pharmacol. Toxicol., núm. 32, p. 417 (1973).
- SALVATORE, G., ANDREOLI, N., ROCHE, J.: Transport function of plasma proteins, ps. 57-73. P. Desgrez i P. M. De Traverse, eds., Elsevier, Amsterdam (1966).
- KELLER, N., RIDARDSON, U. I., YATES, F. E.: Endocrinol., núm. 84, p. 49 (1969).
- POLONOVSKY, J.: Transport function of plasma proteins, ps. 45-55. P. Desgrez i P. M. De Traverse, eds., Elsevier, Amsterdam (1966).
- COOKE, J. R., ROBERTS, L. B.: Clin. Chim. Acta., núm. 26, p. 425 (1969).
- WAHLQVIST, M., NILSSON, I. M., SANDBERG, F., AGURELL, S.: Biochem. Pharmacol., núm. 19, p. 2.579 (1970).
- WIDMAN, M., NILSSON, I. M., NILSSON, J. L. G., AGURELL, S., BORG, H., GRARDS-TRAND, B.: J. Pharm. Pharmacol., núm. 25, p. 453 (1973).
- JUDIS, J.: J. Pharm. Sci., núm. 61, p. 89 (1972).
- CLAUSEN, J.: J. Pharmacol. Exp. Ther., núm. 153, p. 167 (1967).
- FUJITA, T., HANSCH, C.: J. Med. Chem., núm. 10, p. 991 (1967).
- SCHOLTAN, W.: Arzneimittel. Forsch., núm. 18, p. 505 (1968).
- KLOTZ, I. M., WALKER, F. M.: J. Amer. Chem. Soc., núm. 70, p. 943 (1948).
- NAKAGAKI, M., KOGA, N., TERADA, H.: Yakugaku Zasshi, núm. 84, p. 516 (1964).
- MORIGUCHI, I., WADA, S., NISHIZAWA, T.: Chem. Pharm. Bull., núm. 16, p. 601 (1968).
- FUJITA, T.: J. Med. Chem., núm. 15, p. 1.049 (1972).
- AGREEN, A., ELOJSON, R., NILSSON, S. O.: Acta Pharmacol. Toxicol., núm. 29, p. 48 (1971).
- RIMBAU, V., URIACH, J., Pou, J. M.: Arch. Pharmacol. Toxicol., núm. 2, ps. 115-122 (1976).
- RIMBAU, V., Pou, J. M.: Comunicació al II Cong. Nac. Asoc. Esp. Farmacol., Cadis, abril 1976.
- CODINA, J.: Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona (1978).
- RIMBAU, V., Pou, J. M.: Resultats pendents de publicació.

Departament de Fisiologia Animal. Facultat de Farmàcia.
Universitat de Barcelona