

EIWITBINDING VAN POTENTIELE GENEESMIDDELE

J. Zeeman

EIWITBINDING VAN POTENTIELE GENEESMIDDELEN

Inleiding

- Evenwichts dialyse
- Met HPLC op covalent gebonden BSA
- Vergelijking BSA met HSA
- Resultaten met BSA
- Konklusies

Inleiding

Reversibele binding van drugs aan bloed eiwitten speelt een belangrijke rol in het transport en dus het effect van de drug

Huidige methode: Evenwichts dialyse

Theorie:

De binding van een stof aan een eiwit wordt bij één soort bindingsplaats gedefinieerd als

$$\frac{1}{b} = \frac{1}{np} + \frac{1}{nkp} \times \frac{1}{f}$$

k = associatieconstante

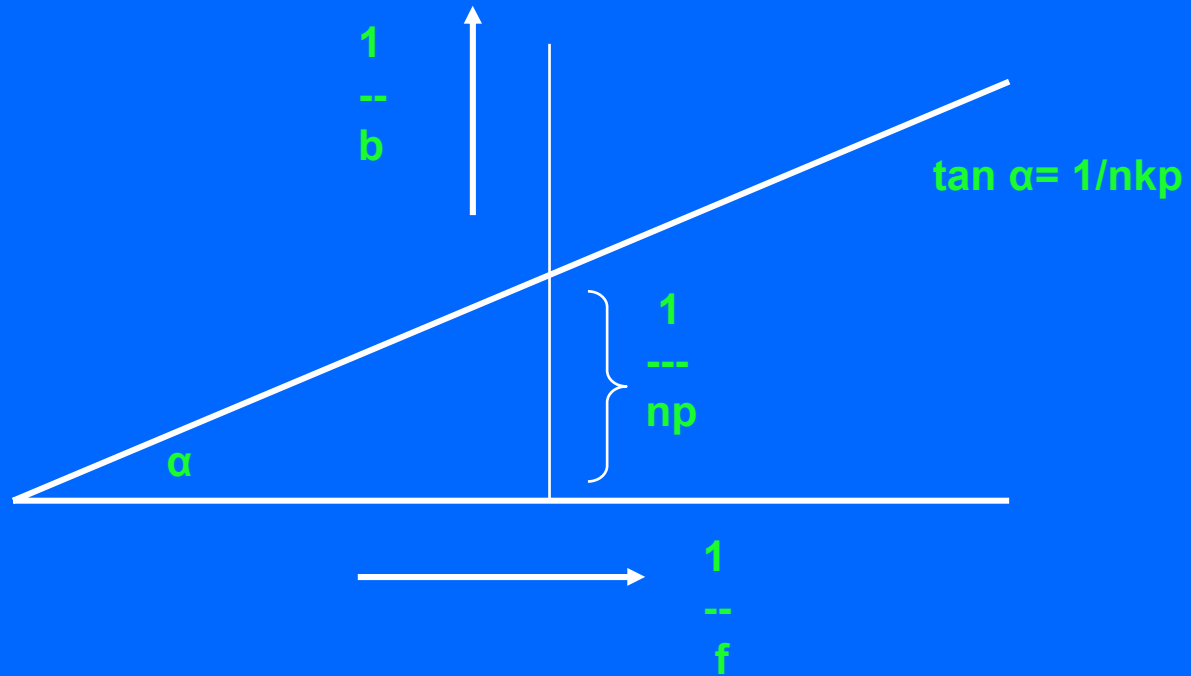
n = aantal bindingsplaatsen op het eiwit

b = mol concentratie van de gebonden stof

f = mol concentratie van de niet gebonden stof

p = mol. eiwitconcentratie

Inleiding



$$\frac{1}{b} = \frac{1}{np} + \frac{1}{nkp} \times \frac{1}{f}$$

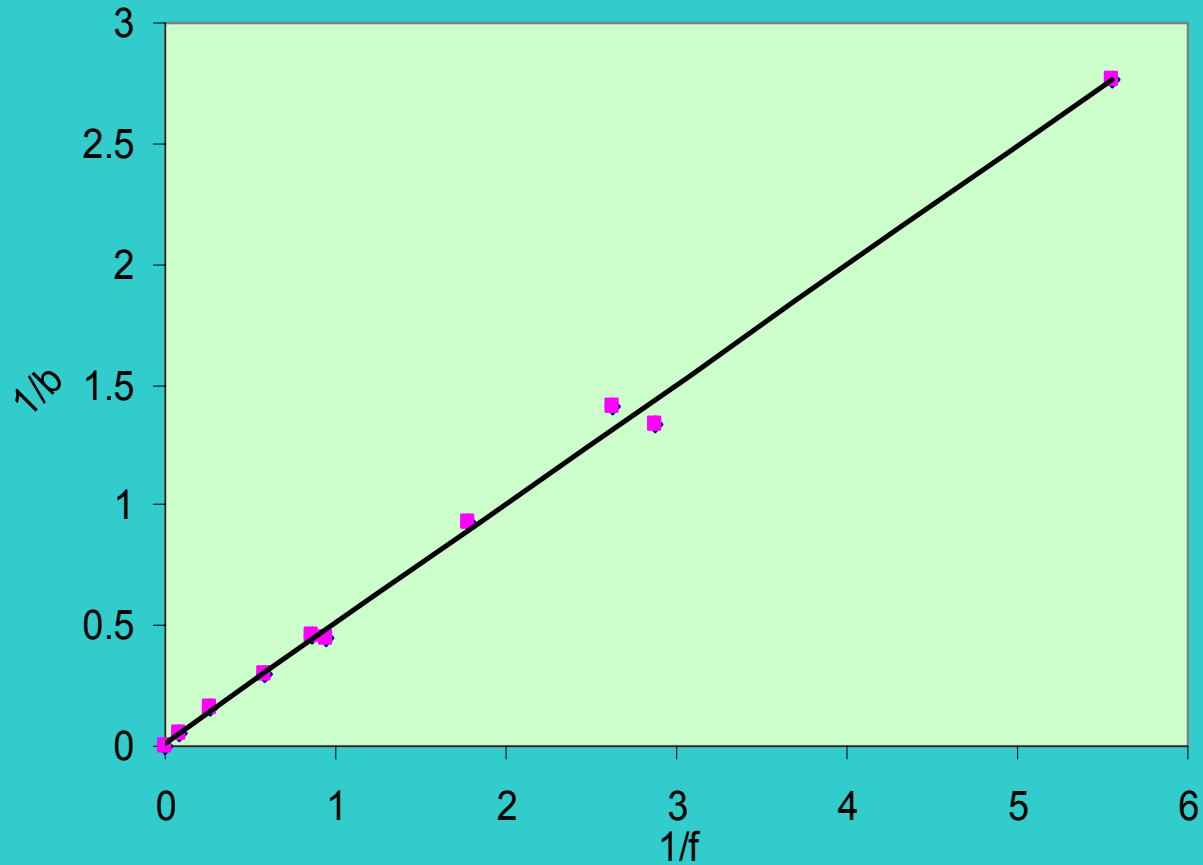
METHODE

- Radio actief materiaal oplossen in 0.1M fosfaatbuffer pH 7.4 in concentraties van 0.3 – 20 µg/ml.
- Dialyseren tegen 4% HSA en 2.7% bloedplasma in 0.1 M fosfaatbuffer.
- Dialyse gedurende 4 uur bij 37° C

Dialyse schema:

Series \ half cell	I	II
1	Drug in buffer	Albumine in buffer
2	Buffer	Drug en albumine in buffer
3	Drug in buffer	Plasma in buffer
4	Buffer	Drug in plasma en buffer

eiwitbinding fluvoxamine



Voordelen

Methode is betrouwbaar

De totale eiwitbinding in bloed wordt bepaald

Nadelen

Methode is bewerkelijk

Methode is tijdrovend, dus kostbaar

Alternatieve methode: RP- HPLC

Eerste publicatie in 1984 van Yashudo en medewerkers:

ODS kolom beladen met BSA en daar monsters over chromatograferen.

Verfijning van de methode toegepast door Allenmark en medewerkers:

BSA covalent gebonden aan silicagel.

Chromatografie van de monsters in 0.1m fosfaatbuffer pH 7.4 met 1 – 3% n-propanol.

Maakt gebruik van een referentie set van sulfonamides met een reeds bekende eiwitbinding

Referentie set

Stof

% binding

Structuur

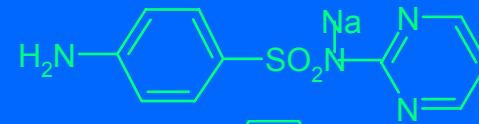
Sulfacetamide

15.7



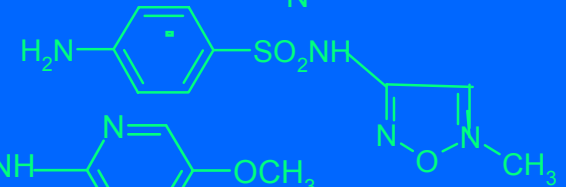
Sulfadioxine

20.4



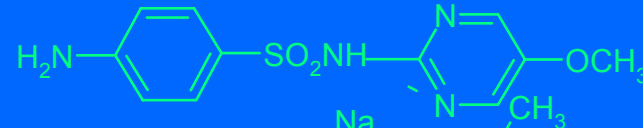
Sulfamethoxazole

63.4



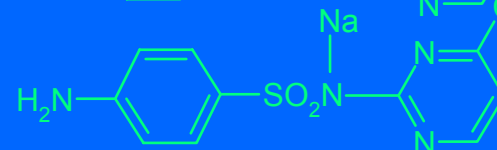
Sulfameter

83.8



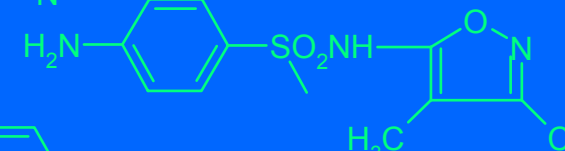
Sulfamerazine

79.4



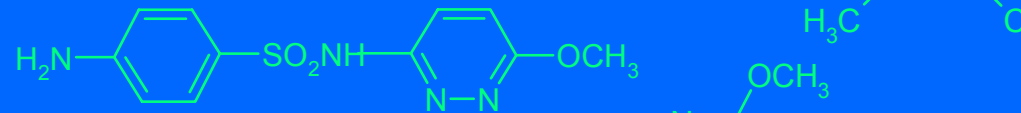
Sulfamethoxypyrazine

88.4



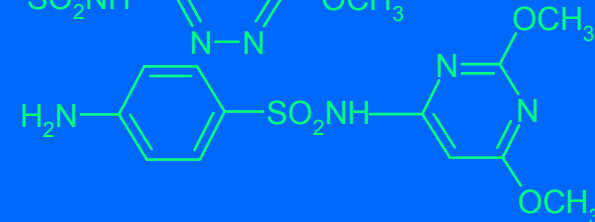
Sulfisoxazole

87.0

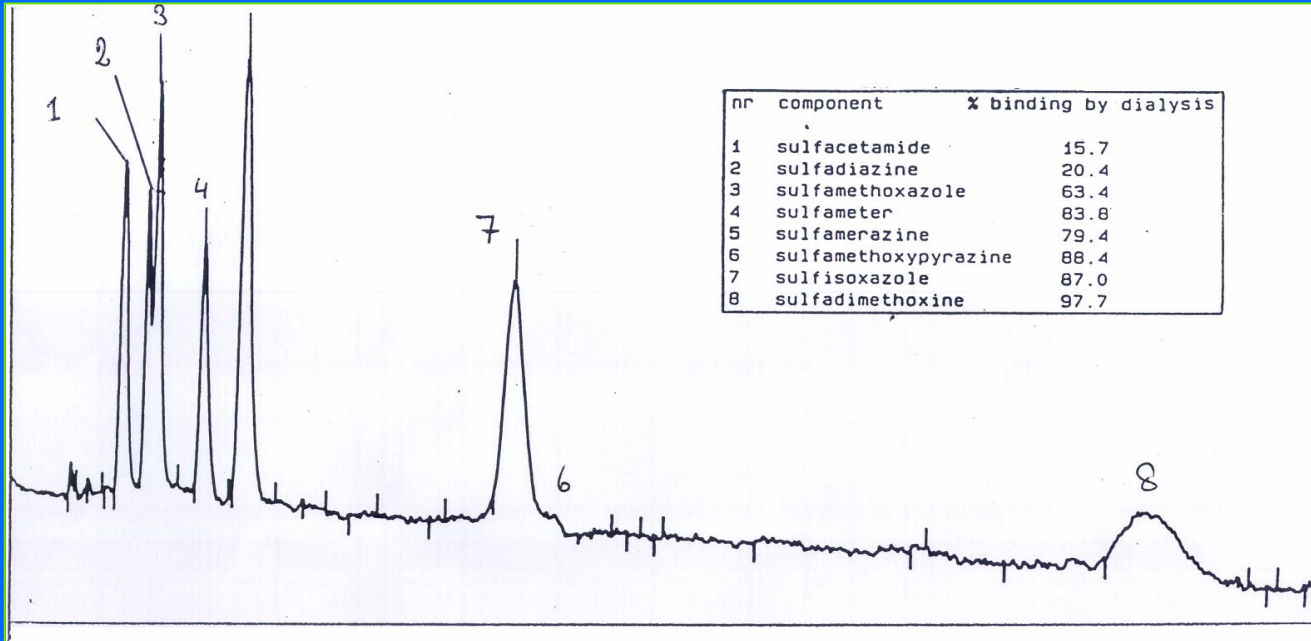


Sulfadimethoxine

97.9



HPLC Chromatogram



Chrom. Condities:

Kolom : Nucleosil BSA, 15x 4.6 mm, 7 µm

Mobiele fase: dinatriumfosfaatbuffer pH7.4 – n-propanol 998 + 2

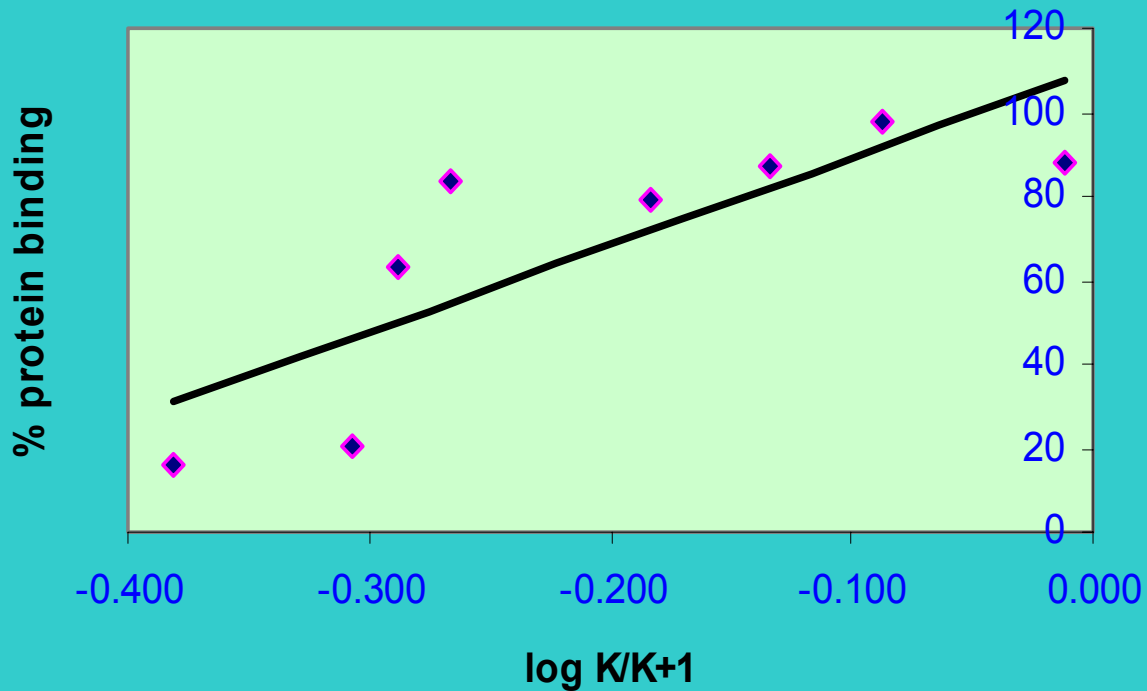
Kolom temp 37 °C

Detectie UV 254 nm

Debiet: 0.5 ml/min

Injektie: 5 µl, 0.1 mg/ml

calibration line with sulfonamides



Problemen

- Monsters onoplosbaar in mobiele fase
- Retentie van de stoffen onacceptabel lang (soms > 2 uur)
- Na berekening percentage eiwitbinding > 100%

Oplossing

- Verhoging percentage propanol naar 20%
- Monsters oplossen in methanol- propanol 1 + 1; doorverdunnen met eluens

Resultaat

- Monsters beter oplosbaar
- Kortere retentietijden

FORMULES

RETENTIE FAKTOR $k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$

t_0 = retentie onvertraagde component
 t = retentie vertraagde component

CAPACITEITSAKTOR $\frac{k}{k + 1}$ of $\log \frac{k}{k + 1}$

Geselecteerd ijkmengsel:

- KALIUM BICHROMAAT

0 %

$K_2Cr_2O_7$

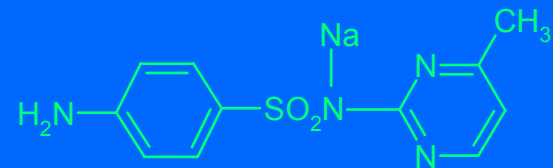
- S-ACEETAMIDE

15.7 %

$H_3C-SO_2NH_2$

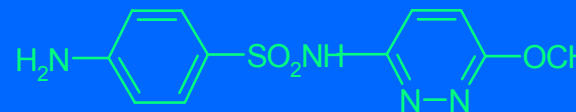
- SÜLFAMERAZINE

79.4 %



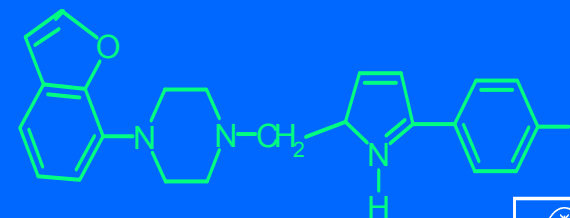
- SULFISOXAZOLE

87.0 %

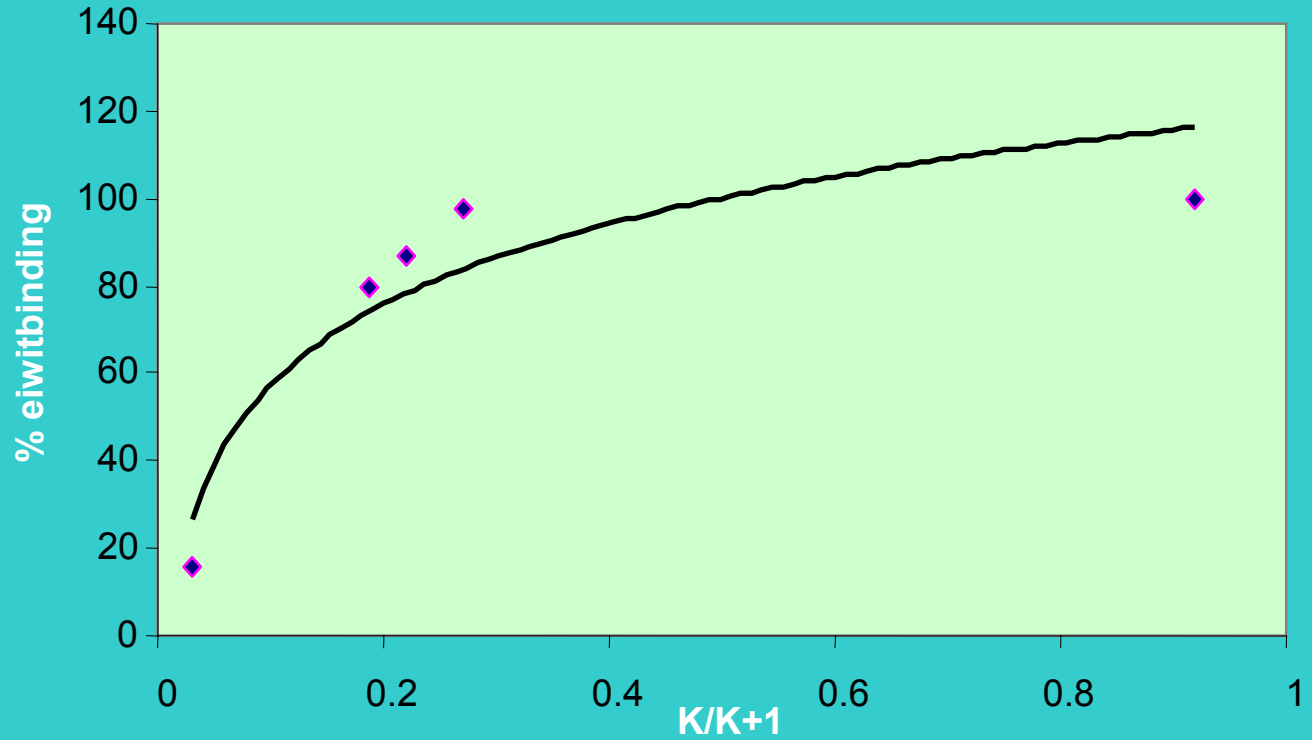


- DU 29894

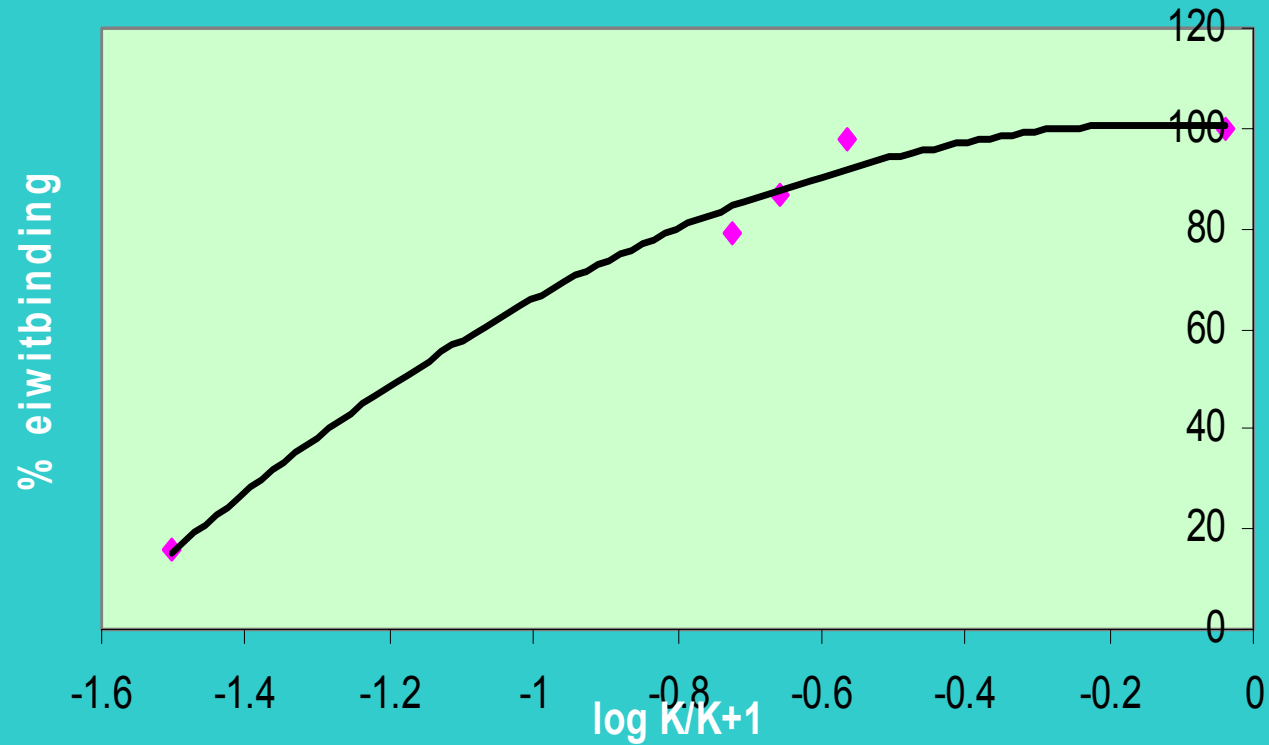
99.8 %



ijklijn referentiestoffen



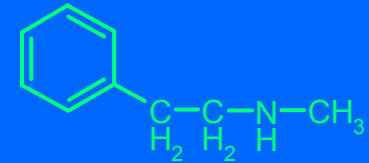
ijklijn referentiestoffen



NIEUWE IJKSET

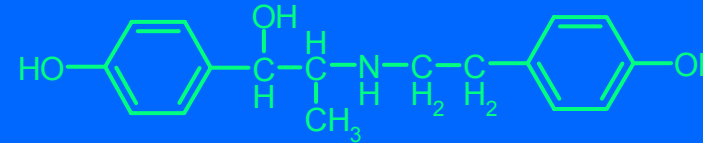
BETAHISTINE

0 %



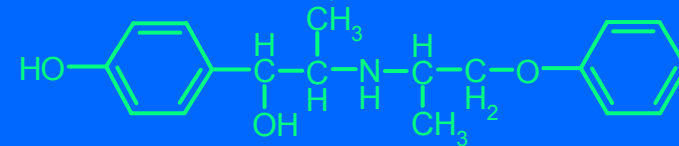
RITODRINE

32.0 %



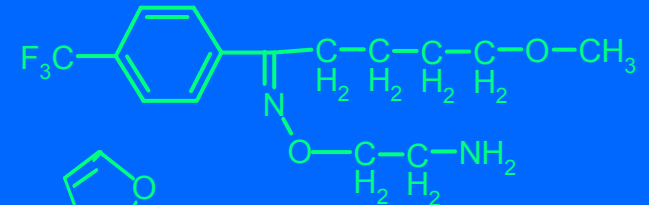
ISOXSUPRINE

64.0 %



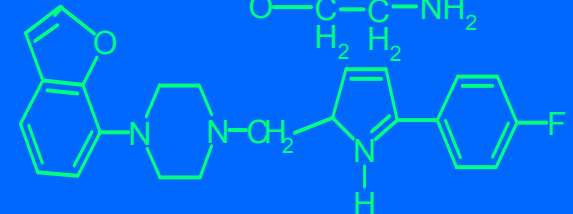
FLUVOXAMINE

77.0 %



DU 29894

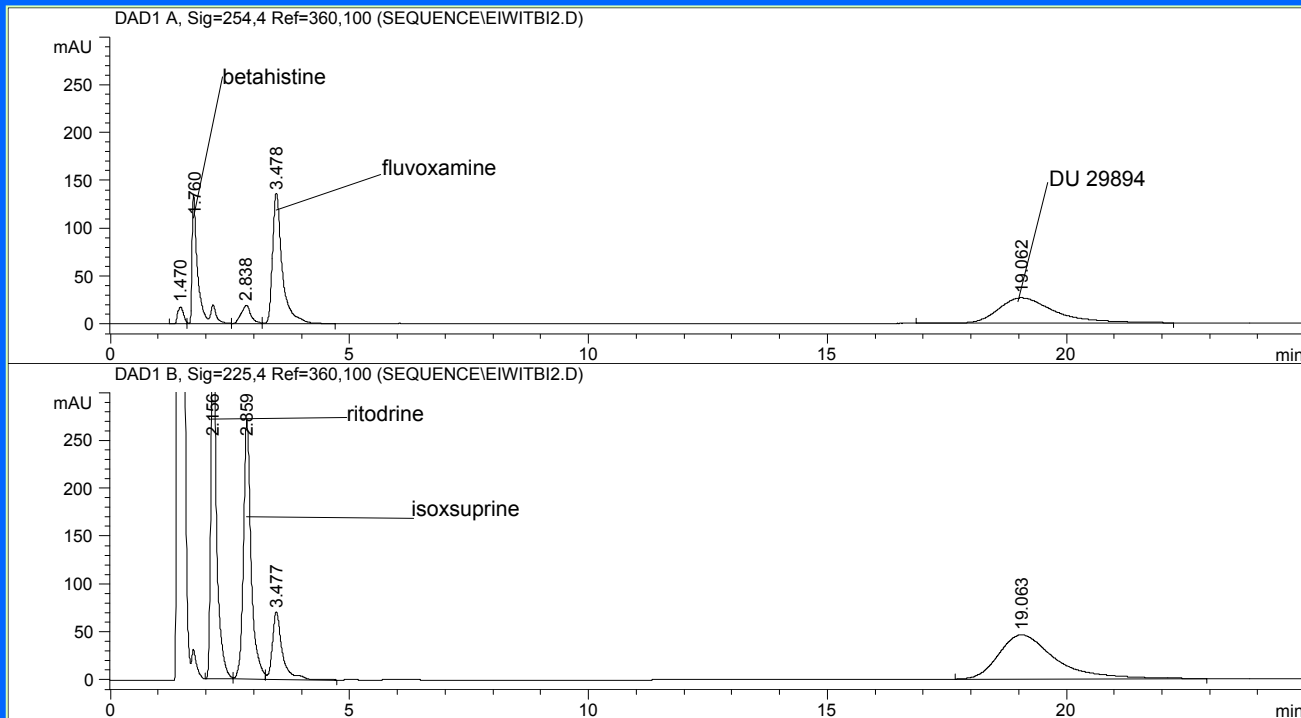
99.8 %



Component X

100 %

HPLC Chromatogram nieuwe ijkset



Chrom. Condities:

Kolom : Nucleosil BSA, 15x 4.6 mm, 7 µm

Mobiele fase: dinatriumfosfaatbuffer pH7.4 – n-propanol 800 + 200

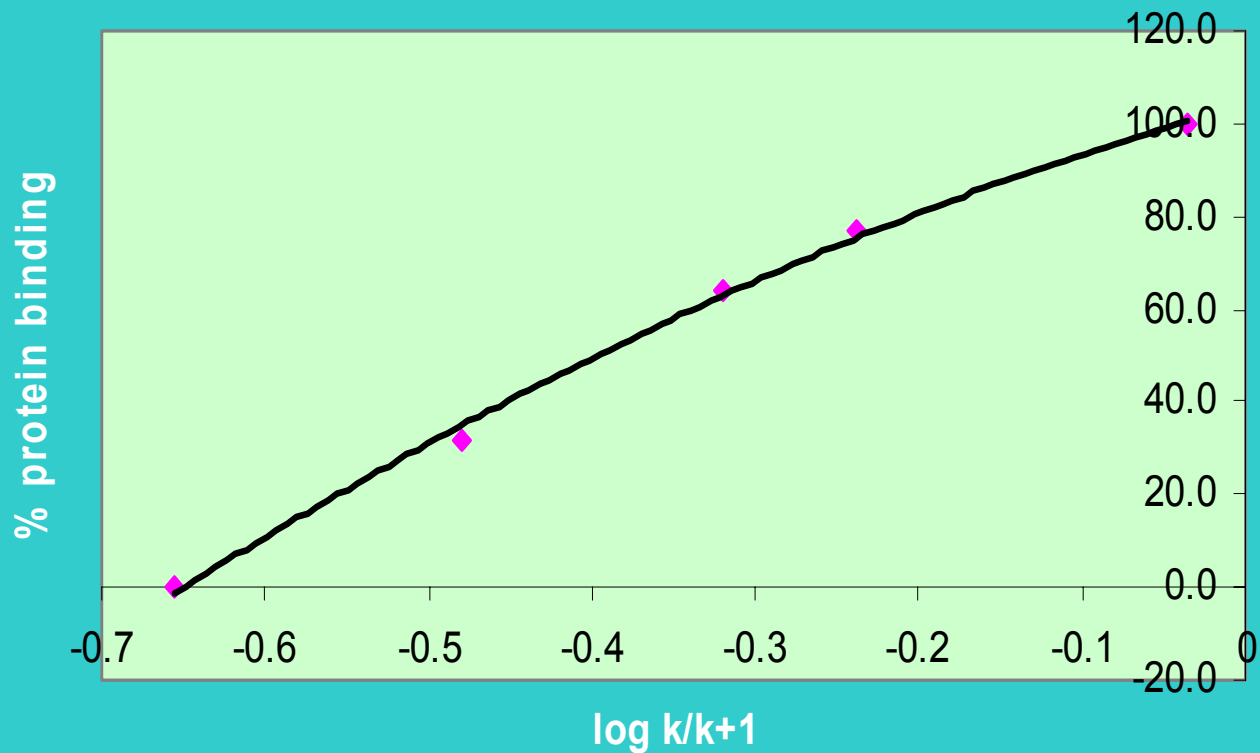
Kolom temp 37 °C

Detectie UV 254 en 225 nm

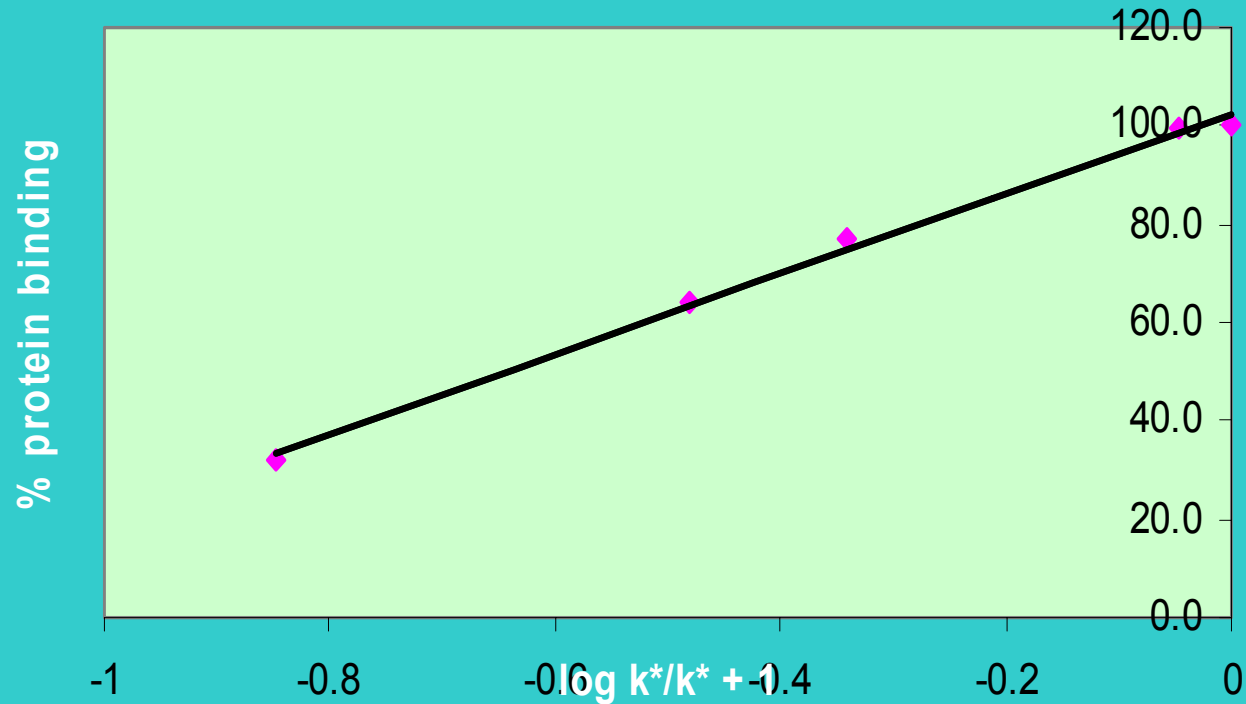
Debiet: 1.0 ml/min

Injctie: 5 µl, 0.1 mg/ml

ijklijn nieuwe referentieset



protein binding based on corrected data



De ijklijn wordt bepaald door $y = ax + b$
 $= 85.08 \cdot \text{Log } k^*/k^* + 1 + 104.66$

Reproduceerbaarheid kolommen

Compound	% protein binding	retention time (min)		
		ALC 87K055 (last results)	9116087	9116088
Column no				
BetaHistine	0.0	3.57	3.48	3.42
Ritodrine	32.0	4.30	4.32	4.18
Isoxsuprine	64.0	5.64	5.74	5.50
Fluvoxamine maleate	77.0	6.86	6.949	6.54
DU 29894	99.8	35.11	38.36	36.12

ALC87K055

$$Y = 89.4346X + 101.8480$$

No 9116087

$$Y = 96.0616X + 101.8228$$

No 9116088

$$Y = 92.6366X + 102.0565$$

Mean $Y = (92.7109 \pm 3.6\%) X + (101.9067 \pm 0.13\%)$

Invloed DMSO als oplosmiddel van de monsters

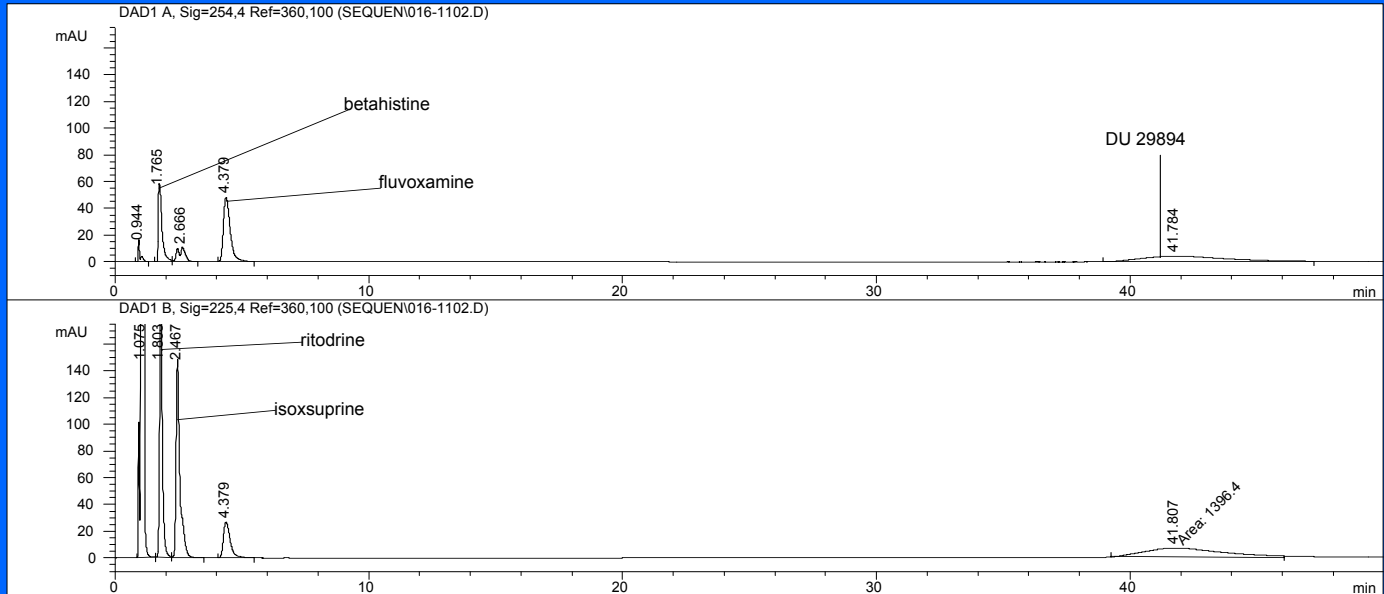
Solvent type	Standard solvent	DMSO concentrated	DMSO diluted	Diluted with methanol – n propanol 1 + 1 V/V	Diluted with methanol – n propanol 1 + 1 V/V and buffer
Regression line	$y=96.062*X+101.823$	$y=98.852*X+101.966$	$y=95.437*X+101.541$	$y=94.651*X+101.693$	$y=94.166*X+101.667$
Coeff. of correlation	0.9987	0.9983	0.9992	0.9990	0.9990
Sample name	Protein binding %	Protein binding %	Protein binding %	Protein binding %	Protein binding %
SLV 308	47.80	44.18	47.12	47.37	48.33
SLV 314	91.38	91.30	91.13	91.33	91.34
DU 27090	95.54	95.66	95.28	95.46	95.46
Tarazepide	96.35	96.57	96.10	96.28	96.32

EQUILIBRATIE TIJD VAN DE KOLOM

Compound	Day 1 (min)		Day 2 (min)	Day 3 (min)	Day 9 (min)
	a.m.	p.m.			
t_r Betahistine	1.73	1.74	1.74	1.74	1.71
t_r Ritodrine	2.06	2.06	2.07	2.07	2.09
t_r isoxsuprine	2.64	2.64	2.65	2.66	2.75
t_r Fluvoxamine	3.09	3.10	3.13	3.14	3.26
t_r DU 29894	15.76	15.76	15.94	16.09	18.09

EIWITBINDING OP EEN HSA KOLOM

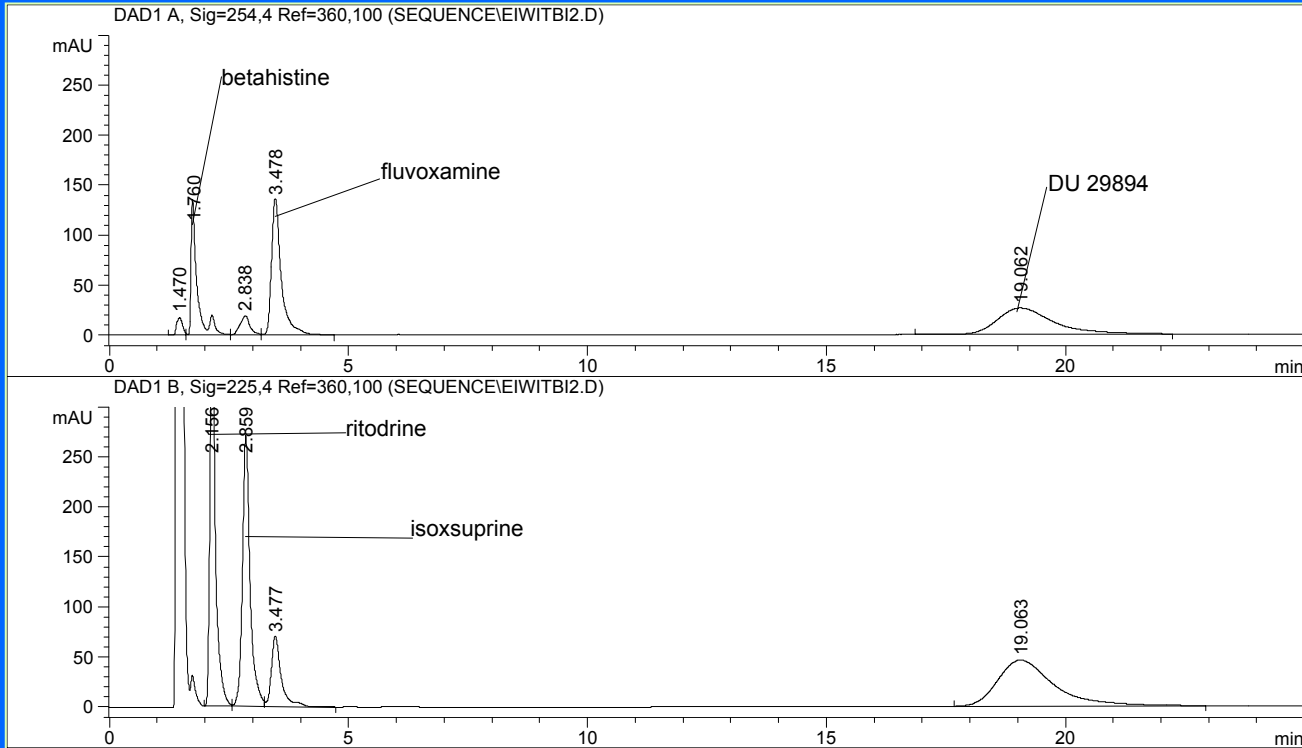
HPLC chromatogram standaard mengsel bij 225 en 254 nm

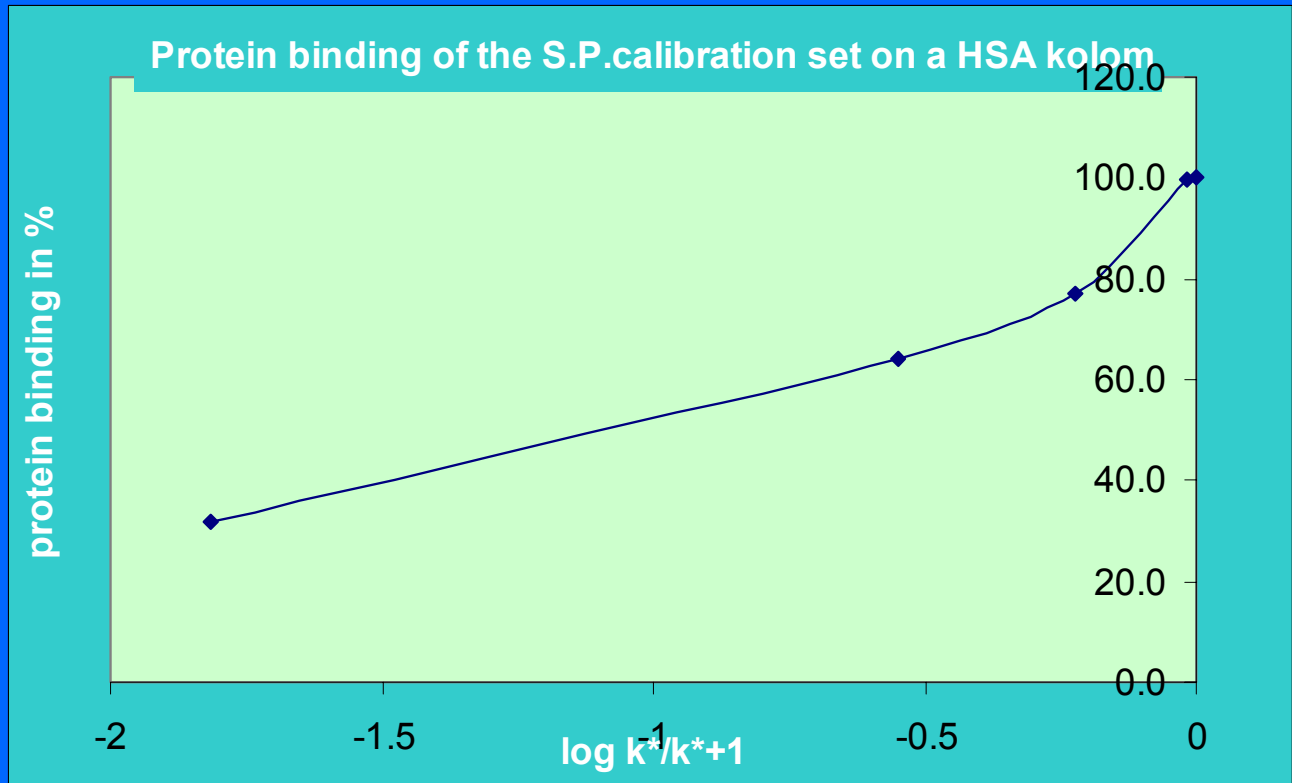


chromatographic conditions:

- Mobile phase: 10% V/V n propanol in 0.05M phosphate buffer pH 7.4.
- Analytical column: HSA silica, particle size 7 μ m. Length 15 cm, i.d. 4.6 mm
- DAD detector: wavelength 220 and 254 nm
- Flow: 2.0 ml/min
- Column oven temperature: 37° C
- Injection volume: 2 μ l

HPLC chromatogram standaard mengsel bij 225 en 254 nm

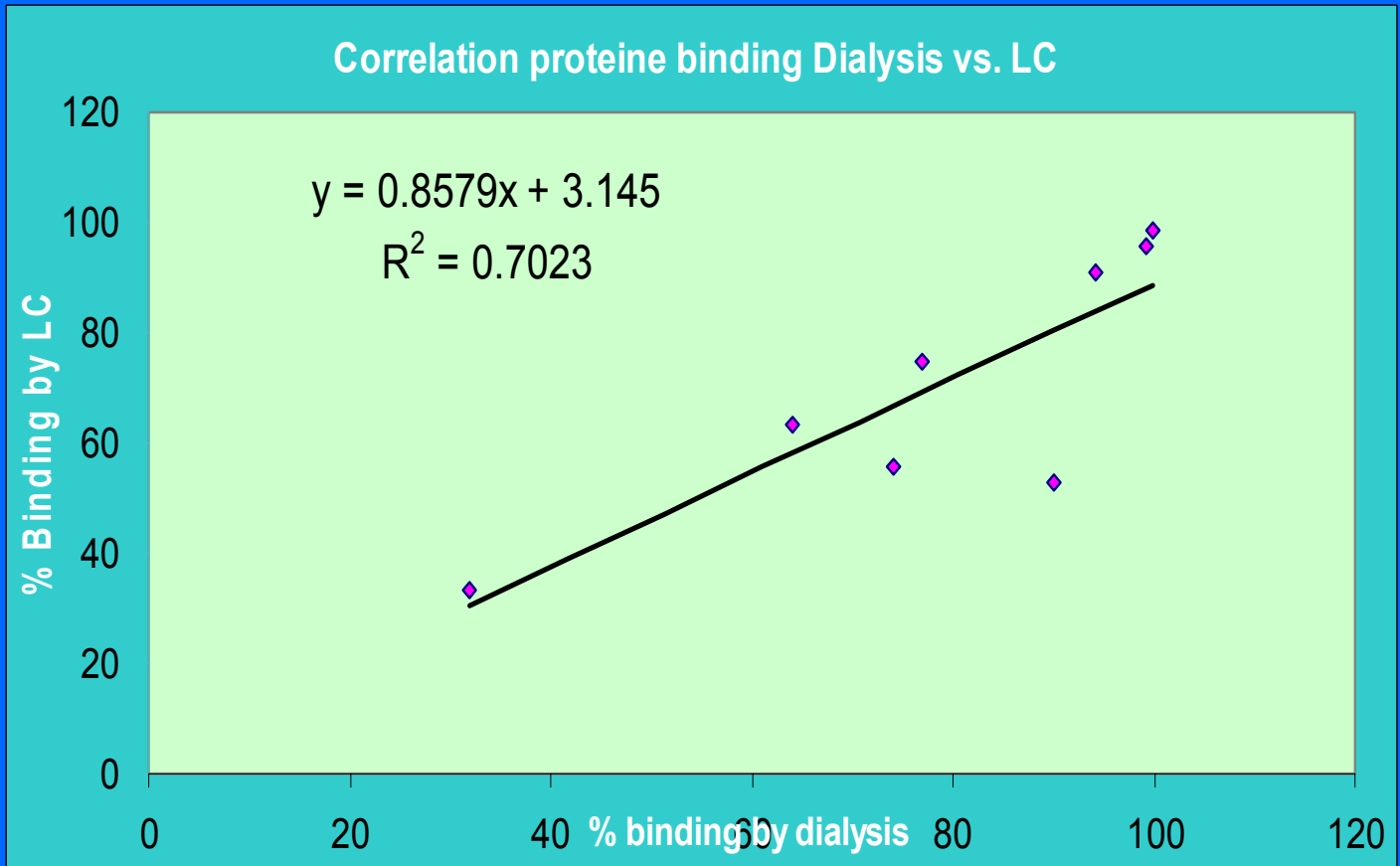




Comparison of the protein binding of the S.P. reference set on BSA and HSA columns

Column type	BSA	HSA	HSA*
Regression line	$Y=94.651 \cdot X+101.693$	$Y=35.181 \cdot X+92.1098$	$Y =106.264 \cdot X+100.862$
Coeff. of correlation	0.9990	0.9566	0.9976
Sample name	Protein binding %	Protein binding %	Protein binding %
SLV 308	47.37	72.24	40.83
SLV 314	91.33	90.30	95.40
DU 127090	95.46	91.32	98.47
Tarazepide	96.28	91.43	98.79

Correlatie eiwitbinding dialyse vs LC



KONKLUSIES

BSA- LC methode is:

Snel vergeleken met evenwichts dialyse methode ; 30 min vs 16 uur

Makkelijk uit te voeren

Stabiel LC systeem

Reproduceerbaar

Ten opzichte van een HSA kolom slechts één calibratie set en één mobiele fase samenstelling nodig.