

Ketoprofen 및 Ketoprofen Lysinate와 Human Serum Albumin의 結合에 관한 研究

李琬夏* · 朴銀錫* · 智雄吉** · 柳柄泰**

成均館大學校 藥學大學* · 忠南大學校 藥學科**

Study on Binding of Ketoprofen and Ketoprofen Lysinate to Human Serum Albumin

Wan Ha Lee, Eun Seok Park, Ung Kil Jee, and Byung Tae Rhyu

(Received May 31, 1983)

Ketoprofen, 2-(3-benzoyl phenyl) propionic acid, has many advantages over the other antiinflammatory drugs, such as salicylates, phenylbutazone, and indomethacin. According to the reports, ketoprofen is well tolerated by patients and has very low incidence of side effects and toxic reactions.

Although ketoprofen is widely used as an antiinflammatory agent, it shows poor solubility in water. In order to enhance water solubility, ketoprofen was made as lysine salt, such as acetylsalicylate lysine salt, ibuprofen lysine salt and amino acid salt of phenylbutazone.

The purpose of this study was to compare with ketoprofen lysinate in aspect of binding to human serum albumin (HSA) were made, and the association constant and the number of binding site were obtained using difference spectrophotometry.

The number of binding site of HSA for ketoprofen and ketoprofen lysinate appears to be 3.3, 3.2 respectively and association constants were found as follow; HSA-ketoprofen $2.23 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, HSA-ketoprofen lysinate $1.02 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$

2-(3-benzoyl phenyl) propionic acid의 화학구조를 갖는 ketoprofen은 強力한 抗염증작용 및 抗류마티스작용을 가지고 있는 鎮痛消炎劑로 널리 사용되고 있다¹⁻²⁾. 毒性은 LD₅₀值가

* College of Pharmacy, Sun Kyun Kwan University

** Department of Pharmacy, Chung Nam National University

indomethacin보다 mouse와 rat에서 경구투여時 20배나 높았고³⁾, rat에서 10~12mg/kg을 40일동안 경구투여한 후에도 血液學的, 病理組織學的인 異狀이 나타나지 않는다는 報告⁴⁾가 있다. 그러나 이 藥物은 물에 녹지않는 製劑上의 특징이 있으므로 李⁵⁾ 등은 ketoprofen을 可溶化시키기 위하여 ketoprofen에 lysine를 結合시켜 ketoprofen lysinate를 製造하였으며 이를 ketoprofen과 비교한 결과 鎮痛作用, 消炎作用 및 解熱作用이 증가하였음을 報告하였다. 또한 ketoprofen 50mg/kg 및 ketoprofen lysinate 78.8mg/kg (=ketoprofen 50mg/kg에 해당)을 家兎에 경구투여하여 30분 후에 測定한 ketoprofen 및 ketoprofen lysinate의 혈중농도가 각각 116 μ g/ml와 150 μ g/ml이었고, 그 후 급속히 감소하여 6시간 후에는 각각 24 μ g/ml 및 19 μ g/ml이었으며 尿中排泄量도 처음 10시간까지는 ketoprofen lysinate가 현저히 많았으나 10~48시간 사이에 배설된 양은 ketoprofen보다 현저히 적었다는 결과에 비추어 ketoprofen lysinate가 ketoprofen보다 速效성임을 推定하였다.

이는 藥物의 效能, 生體利用率, 吸收, 代謝 및 排泄에 크게 영향을 미치는 因子로서 알려진 藥物의 血漿蛋白質과의 結合과 상호연관성이 추측되는 바이다⁶⁾. 특히 투여된 藥物은 血液中에서 遊離狀態로 존재하는 藥物만이 作用部位에서 藥物效果를 發現하는데 기여한다⁷⁾. 따라서 藥物의 bioequivalence 및 有效性を 推定하는 間接的인 指標로서 血清蛋白質 그 중에서도 albumin과 結合하는 樣狀을 糾明하는 것이 중요한 研究課題로 되어있다⁸⁻⁹⁾.

이에 著者는 2-(4'-hydroxy benzeneazo) benzoic acid (이하 HBAB라 칭한다)를 probe로 사용하여 ketoprofen 및 이를 可溶化한 ketoprofen lysinate와 human serum albumin(이하 HSA라 칭한다) 간의 結合常數 및 結合部位의 數를 difference spectra를 이용한 방법으로 測定하였으며 그 결과를 이에 報告하고자 한다.

實驗方法

測定方法—0.05M의 phosphate buffer solution(pH 7.4)(이하 PBS라 칭한다)으로 調劑한 1.5×10^{-4} M 溶液을 高濃度 HSA溶液으로 하고, 2.98×10^{-5} 溶液을 低濃度 HSA溶液으로 사용하였다. 高濃度 HSA溶液은 添加된 probe全量이 HSA와 結合할 수 있는 濃度로 Zia¹⁰⁾ 등의 방법에 준하여 결정하였다.

高濃度 및 低濃度の HSA溶液 4ml에 1×10^{-2} M의 HBAB methanol溶液을 microsyringe로 10 μ l씩 10, 20, 30, …, 100 μ l까지 順次的으로 가하여 攪拌시킨후 37°C에서 1時間 放置하였다. PBS와 HSA溶液을 兩則에 넣은 2개의 tandem cell을 각각 reference beam과 sample beam에 평행하게 놓고 base line을 그린 후에 reference cell의 PBS와 sample cell의 HSA溶液 대신에 probe로 적정한 PBS와 probe로 적정한 HSA溶液을 넣은 다음 485nm에서 difference absorbance를 測定하였다.

또 ketoprofen 및 ketoprofen lysinate를 각각 1×10^{-4} M씩 함유하는 低濃度 HSA溶液에

probe를 10 μ l씩 10, 20, 30, …… 100 μ l까지 順次的으로 가하여 上記와 동일한 방법으로 difference absorbance를 測定하였다.

Data處理—高濃度 및 低濃度の HSA溶液 및 ketoprofen 및 ketoprofen lysinate를 각각 1 \times 10⁻⁴M씩 함유하는 低濃度 HSA溶液에 대해 probe의 濃度を 順次的으로 變化시키며 測定하였을 때 HBAB와 HSA와의 結合으로 나타나는 difference absorbance와 ketoprofen 및 ketoprofen lysinate의 存在에 의한 吸光度의 減少로부터 HBAB 및 ketoprofen 그리고 ketoprofen lysinate의 結合常數를 計算하였다.

먼저 Brand¹¹⁾ 등의 방법에 따라 HBAB와 HSA와의 結合分率(x)을 다음 式으로 計算하였다.

$$x = \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2}$$

ΔA_1 = 低濃度 HSA溶液에 있어서의 HBAB의 difference absorbance

ΔA_2 = 高濃度 HSA溶液에 있어서의 HBAB의 difference absorbance

특히 ΔA_2 는 일정한 濃度の probe에 대하여 몇 가지 서로 다른 濃度の HSA溶液의 difference absorbance를 測定하여 1/ ΔA 對 1/[P]의 plot의 intercept를 보정하여 구하였으며, 이때 [P]는 HSA의 總濃度を 나타낸다.

모든 測定곡선의 각 점에서의 probe의 結合分率(x)을 Scatchard 方程式¹²⁾에 따라 處理하였다.

$$\frac{\bar{V}}{A} = nK_a - VK_a$$

\bar{V} = HSA 1分子當 結合한 HBAB의 分子數(단, \bar{V} 는 測定한 HBAB의 濃도에 結合分率(x)을 곱하고 이것을 低濃度 HSA溶液의 濃도로 나누어서 구한다.)

A = 遊離 HBAB의 濃度 {단, A는 測定한 HBAB의 濃도에 (1-x)값을 곱하여 구한다.}

n = HSA 1分子에 HBAB가 結合할 수 있는 結合部位의 數

K_a = HBAB의 結合常數

HBAB의 測定으로 얻어진 結合에 관한 data들을 Scatchard plot하여 未知의 regression parameters인 K_a 및 n值를 最小제곱法으로 구한 直線의 기울기 및 x축 절편에서 얻었다.

여기에서 얻은 K_a 值와 n值를 Klotz方程式¹³⁾에 適用시켜서 ketoprofen과 ketoprofen lysinate의 結合常數를 구하였다.

$$K_b = \frac{n[P_0]K_a[A] - K_a[A][PA] - [PA]}{[B_1]K_a[A] - n[P_0]K_a[A] + K_a[A][PA] + [PA]} \times \frac{K_a[A]}{[PA]}$$

K_b = HBAB와 競爭의으로 結合하는 藥物의 結合常數

K_a = HBAB의 結合常數

[A] = 遊離 HBAB의 濃度

[PA] = 結合 HBAB의 濃度

[P₀] = 低濃度 HSA溶液의 濃度

n = HSA 1分子에 HBAB가 結合할 수 있는 結合部位의 數

[B₁] = HBAB와 競爭의으로 結合하는 藥物의 總濃度

實驗結果 및 考察

遊離狀態로 存在하는 HBAB의 UV absorption spectrum과 HSA에 結合한 HBAB의 UV absorption spectrum은 Fig.1과 같다. HBAB가 HSA에 結合하면 신속하며 可逆的인 吸光度의 변화가 뚜렷하게 나타난다. 이 두 吸光度의 差異를 나타낸 difference spectra를 Fig.2에 나타내었다. 이 spectra는 278nm와 485nm에서 2개의 positive peak와 360nm에서 1개의 negative peak를 나타내는데 이 實驗에서는 485nm에서 吸光度를 測定하여 data를 處理하였다. 또한 Fig.3은 HBAB와 ketoprofen, HBAB와 ketoprofen lysinate를 첨가하였을 경우에 HSA에 結合한 HBAB의 UV absorption spectrum이다. 이 spectra에서 ketoprofen 및 ketoprofen lysinate가 HBA와 競爭的으로 HSA에 結合하여 遊離狀態의 HBAB의 濃度を 증가시켰음을 알 수 있다.

Fig.4는 HBAB-HSA의 difference absorbance를 HBAB의 濃도에 따라 plot한 것이다. 直線 E의 각 點의 값은 $1/4A$ 對 $1/[P]$ 의 plot의 intercept를 보정하여 얻은 것이다.

HSA와 藥物的 濃度を 일정하게 놓고, HBAB의 濃度を 변화시키면서 difference absorbance를 測定한 吸收曲線은 Fig.5에 나타내었다. 이 吸收曲線에서 高濃度 HSA溶液은 過量의 結合部位가 存在하므로 HBAB의 濃도가 증가함에 따라 difference absorbance가 直線的으로 증가하고, 低濃度 HSA溶液에서는 HBAB濃도가 증가함에 따라 結合部位가 飽和되므로 적정곡선이 휘어지게 된다. 특히 $5 \times 10^{-5}M$, $10 \times 10^{-5}M$, $15 \times 10^{-5}M$, $15 \times 10^{-5}M$, $20 \times 10^{-5}M$ 濃度の HBAB가 HSA에 단독으로 結合하였을 때 나타나는 difference absorbance는 각각

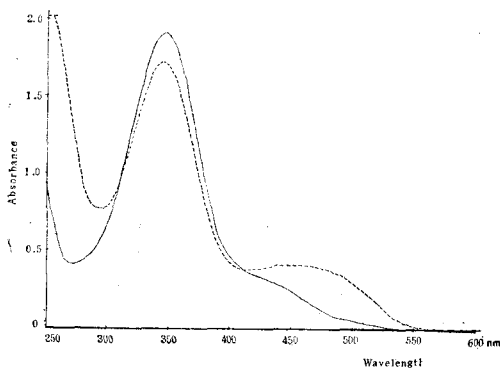


Figure 1—Spectral change of HBAB bound to human serum albumin. Key: —, $1 \times 10^{-4}M$ HBAB; ---, $1 \times 10^{-4}M$ HBAB and $2.98 \times 10^{-5}M$ human serum albumin in 0.05M phosphate buffer, pH 7.4 at 37°C.

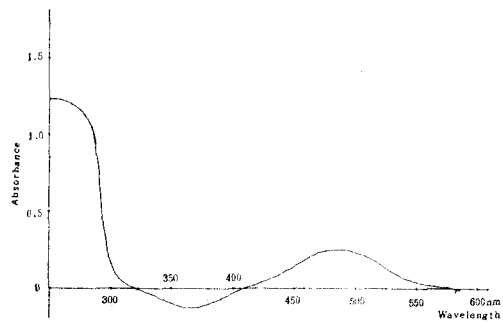


Figure 2—Difference spectra of HBAB ($1 \times 10^{-4}M$) and human serum albumin ($2.98 \times 10^{-5}M$) in 0.05M phosphate buffer, pH 7.4 at 37°C.

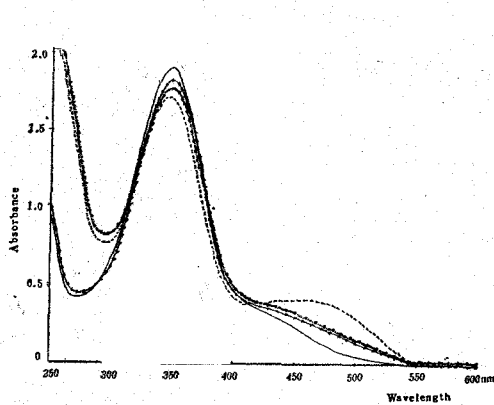


Figure 3—Spectral change of HBAB, ketoprofen, and ketoprofen lysinate bound to human serum albumin. Key: —, $1 \times 10^{-4}M$ HBAB; ·····, $1 \times 10^{-4}M$ HBAB and $2.98 \times 10^{-5}M$ HSA; *-*-*-, $1 \times 10^{-4}M$ HBAB and $2.98 \times 10^{-5}M$ HSA and $1 \times 10^{-4}M$ ketoprofen; ···□···□···, $1 \times 10^{-4}M$ HBAB and $2.98 \times 10^{-5}M$ HSA and $1 \times 10^{-4}M$ ketoprofen lysinate in 0.05M phosphate buffer, pH 7.4 at $37^{\circ}C$.

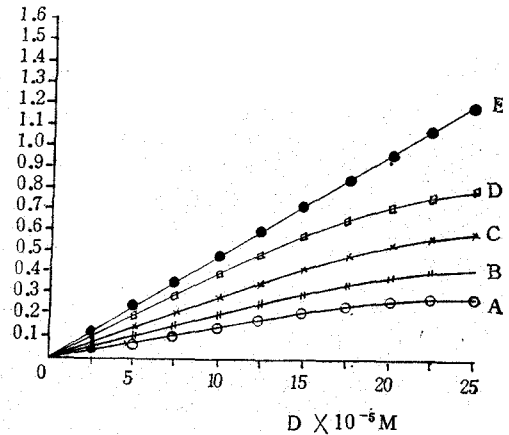


Figure 4—Absorbance differences as a function of the 2-(4'-hydroxybenzeneazo) benzoic acid concentration, at various human serum albumin concentrations. Key: A, $2.98 \times 10^{-5}M$; B, $3.45 \times 10^{-5}M$; C, $4.6 \times 10^{-5}M$; D, $6.9 \times 10^{-5}M$. The theoretical line (E) is based on calculated values of absorbance difference for high concentrations of human serum albumin.

0.151, 0.235, 0.301, 0.352이며, ketoprofen lysinate가 첨가되었을 때는 0.138, 0.207, 0.254, 0.293으로 되었고 ketoprofen이 첨가되었을 때는 0.112, 0.177, 0.223, 0.252로 감소함을 보여주고 있는데 이는 두 藥物이 HSA分子的 結合部位에서 HBAB와 競爭的으로 結合하며 또한 ketoprofen이 ketoprofen lysinate보다 吸光度를 더 많이 감소시키므로 HSA와의 親和性이 크다는 것을 알수있다(Table 1).

이 data를 Scatchard plot하여 Fig. 6에 나타내었다. 여기에서 HBAB만 단독으로 HSA에 結合하였을 때의 x 축 절편은 4.09로 이는 結合部位의 數가 HSA에 있어서 4.09임을 나타낸다. 또한 ketoprofen lysinate 및 ketoprofen을 첨가하였을 때의 x 축 절편은 3.24, 3.30으로 이는 HSA에 대한 結合部位의 數가 3.24, 3.30으로서 HBAB와 두 藥物이 인접한 結合部位에서 競爭的으로 結合함을 나타낸다.

HSA와 結合한 HBAB가 나타내는 直線의 기울기는 結合常數를 나타내며 이 기울기는 競爭藥物인 ketoprofen 및 ketoprofen lysinate가 첨가됨에 따라 減少하고 있다. 이 實驗條件에서 HSA와 HBAB의 結合常數는 $1.02 \times 10^4 M^{-1}$ 이였으며, 이 數值를 Klotz方程式에 適用하여 구한 HSA와 ketoprofen의 結合常數는 $2.23 \times 10^4 M^{-1}$, HSA, ketoprofen lysinate의 結合常數는 $1.02 \times 10^4 M^{-1}$ 이였다. 이때의 結合部位는 모두 主結合部位라고 생각되는데 보통 副

Table 1—The Data were Treated According to the Scatchard Equation in Solution of $2.98 \times 10^{-5}M$ Protein Concentration, The Protein Solution of Low Protein $1 \times 10^{-4}M$ Ketoprofen and The Protein Solution with $1 \times 10^{-4}M$ Ketoprofen Lysinate with successive Increments of 2-(4'-hydroxy benzeneazo) Benzoic Acid(=HBAB)

Concentration of HBAB ($\times 10^{-5}M$)	*		x	\bar{V}	$\frac{\bar{V}}{A}$ ($\times 10^4$)	c)	x	\bar{V}	$\frac{\bar{V}}{A}$ ($\times 10^4$)	d)	x	\bar{V}	$\frac{\bar{V}}{A}$ ($\times 10^4$)
	a)	b)											
2.5	0.158	0.092	0.58	0.48	4.5	0.060	0.37	0.30	1.90	0.081	0.51	0.42	3.40
5	0.303	0.151	0.49	0.82	3.2	0.112	0.36	0.06	1.80	0.138	0.45	0.75	2.72
7.5	0.434	0.201	0.46	1.15	2.8	0.149	0.34	0.85	1.71	0.180	0.41	1.04	2.30
10	0.567	0.235	0.41	1.37	2.3	0.177	0.31	1.04	1.50	0.207	0.36	1.20	1.87
12.5	0.668	0.267	0.39	1.63	2.1	0.201	0.30	1.25	1.42	0.234	0.35	1.46	1.80
15	0.778	0.301	0.38	1.91	2.0	0.223	0.28	1.40	1.29	0.254	0.32	1.61	1.57
17.5	0.888	0.335	0.37	2.17	1.9	0.239	0.26	1.52	1.17	0.278	0.31	1.81	1.50
20	0.987	0.532	0.35	2.34	1.8	0.252	0.25	1.67	1.11	0.293	0.29	1.94	1.36
22.5	1.080	0.371	0.34	2.56	1.7	0.264	0.24	1.81	1.05	0.311	0.28	2.11	1.30
25	1.143	0.393	0.34	2.85	1.7	0.270	0.24	1.92	0.90	0.323	0.08	2.34	1.30

- a) : Difference absorbance in solution of high protein concentration
- b) : Difference absorbance in solution of low protein concentration
- c) : Difference absorbance in solution of low protein concentration + $10^{-4}M$ ketoprofen
- d) : Difference absorbance in solution of low protein concentration + $10^{-4}M$ ketoprofen lysinate

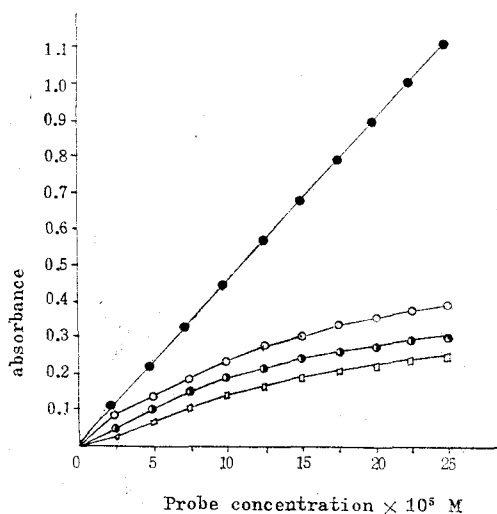


Figure 5—Absorbance differences as a function of HBAB concentration at higher (—●—) and lower (—○—) human serum albumin concentration. Curves, —□— and —○—, are the titration curves of lower albumin concentration with HBAB in the presence of ketoprofen and ketoprofen lysinate respectively.

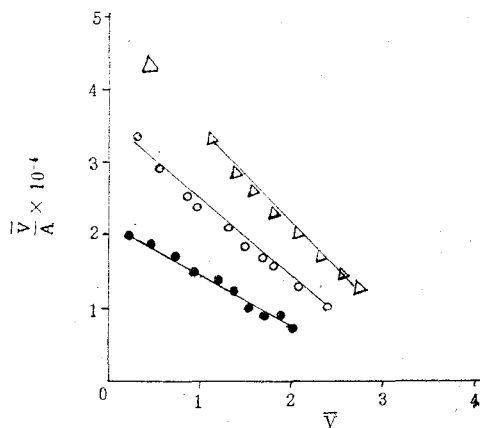


Figure 6—Scatchard plots of HBAB binding to human serum albumin in 0.05M phosphate buffer, pH 7.4 at 37°C. Key: Δ , in absence of drugs; \bullet , in presence of $1 \times 10^{-4}M$ ketoprofen; \circ , in presence of $1 \times 10^{-4}M$ ketoprofen lysinate.

結合部位의 結合常數는 $1 \times 10^9 M^{-1}$ 이하이다. 또 이 實驗의 結果가 Scatchard plot에서 거의 直線으로 나타나는 것으로 보아 이들 結合部位는 모두 동일한 結合力을 가지고 있다고 생각된다.

結 論

Difference spectrophotometry를 利用하여 ketoprofen 및 ketoprofen lysinate와 血清蛋白과의 結合에 관한 性質을 檢討하였다.

1. Probe로 사용된 HBAB와 ketoprofen 및 ketoprofen lysinate는 human serum albumin에 있어서 동일한 結合力을 나타내고 각각 4.1, 3.3, 3.2의 結合部位를 가지고 있다.

2. 本 實驗條件에서 ketoprofen lysinate는 ketoprofen보다 human serum albumin에 대한 親和力이 적었으며 結合常數는 각각 다음과 같다.

HSA-ketoprofen lysinate : $1.02 \times 10^4 M^{-1}$

HSA-ketoprofen : $2.23 \times 10^4 M^{-1}$

文 獻

- 1) A.N. Gyory, M. Bloch, H.C. Burry, R. Grahme, *Brit. Med. J.*, **18**, 398(1972)
- 2) H. Fujimura, K. Tsurum, *藥誌*, **70**, 801(1974)
- 3) A. Mukaide, T. Kameyama, *藥理誌*, **77**, 553 (1975)
- 4) H. Fujimura, K. T. Tsurumi, *應用藥理*, **8**, 1285(1974)
- 5) W.H. Lee, J.B. Kim, U.K. Jee, and B.T. Rhyu, *J. Korean Pharm. Sci.*, **12**(2), 37-34 (1982)
- 6) S.I. Oraszlam and, G.D. Davis, *Biochem. Pharmacol.*, **11**, 1203 (1962)
- 7) M. Gibaldi, "Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics" 2nd Ed., Lea & Fetiger P.89(1977)
- 8) J. J. Vallener, *J. Pharm. Sci.*, **66**, 447(1977)
- 9) M.C. Meyer, and D.E. Guttman, *J. Pharm. Sci.*, **57**, 895(1968)
- 10) H. Zia, and James C. Price, *J. Pharm. Sci.*, **64**, 1177(1975)
- 11) L. Brand, J.R. Gohlek, and D.S. Rao, *Biochem.*, **6**, 3510(1967)
- 12) G. Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **51**, 660(1949)
- 13) I.M. Klotz, T.H. Triwush, and H.M. Walker, *J. Ame. Chem. Soc.*, **70**, 2935, (1948)