(63) KUPCHAN, S. M., TAGASUGI, M., SMITCH, R. M., PTEYN, P. S.: «Chem. Comm.», 969 (1970).
(64) KUPCHAN, S. M., DOSKOTCH, R. W., BOLLINGER, P., PHAIL, A. T., SIM, G. A., SÁENZ RENAULD: «J. Ame. Chem. Soc.», 87, 5806 (1965).
(65) LAVIE, D., GLOTTER, E., SHOU, Y.: «J. Chem. Soc.», 7117 (1965).
(66) SIZBA, J., DOLEIS, L., HERONT, V., SORM, F., FEHLHABER, H. W., SNATEKE, G., TOCHESCHE, R., WULFF: «Chem. Ber.», 104, 837 (1971).
(67) HABU SHAG, T. O. SOINE: «J. Ame. Pharm. Asoc.», 43, 387 (1953).
(68) R. W. DOSTOTTCH, F. S. ELFERALI: «J. Org. Chem.», 35, 1928 (1970).
(69) KUPCHAN, S. M., AYUNARCHI, Y., CASADY, S. M., SCHONES, H. K., BORLINGANE, A. L.: «J. Org. Chem.», 34, 3876 (1969).
(70) KUPCHAN, S. M., HEMINGWAY, R. R., KARIN A. WENER: «J. Org. Chem.», 34, 3903 (1969).
(71) KUPCHAN, S. M., HEMINGWAY, R. R., KARIN A. WENER: «J. Org Chem.», 34, 3876, 3908 (1969).
(72) KUPCHAN, S. M., KARIN, A.: «Marrocks C. J. Org. Chem.», 34, 3912 (1969)
(73) KUPCHAN, S. M., SIEGUAL, C. N., MATZ, M. S., SÁENZ RENAULD, S. B., HALTIWANGER, R. C., BRYAN, R. F.: «J. Ame. Chem. Soc.», 92, 4476 (1970).
(74) POLONSKY: «Chem. Org. Naturst.», 30, 101 (1973).
(75) KUPCHAN, S. M., BRITTON, R. M., LACADIE, J. A., ZIEGLER, M. F.: «J. Org. Chem.», 40, 654 (1975).
(76) KUPCHAN, S. M., LACADIE, J. A.: «J. Org. Chem.», 40, 654 (1975).
(77) WEISS, S. G., TIN-WA, M., PERDUE, R. E. JR., FARNSWORTH, N. R.: «J. Pharm. Esci.», 64, 95 (1975).
(78) KUPCHAN, S. M., BRITTON, R. W., ZEIGLER, M. F., GILMORE, C., J. RESTIVO, R. S., BRYAN, R. F.: «Ame. Chem. Soc.», 95, 1315 (1973).

An. Real Acad. Farm. 1979, 45: 199-212

Paramètres pharmacocinétiques et activité thérapeutique

Etude d'une série d'amides crésotiniques et de dérivés de cetoacides aromatiques

R. MARIGNAN
Faculté de Pharmacie. Montpellier (France)

Discurso de ingreso como Académico correspondiente extranjero

Sesión del 7 de diciembre de 1978

Les travaux qui font l'objet de cet exposé ont été réalisés ces dernières années et sont actuellement poursuivis et développés. Ils sont dus à un travail d'équipe et plus particulièrement à M. Chanal, Mme. Bret, M. M. Dubreuil et Audran. Ils portent sur deux séries de molécules qui ont été synthétisées et étudiées par les Laboratoires Pierre Fabre.

Nous présentons aujourd'hui les résultats des études pharmacocinétiques.

Réaliser une étude pharmacocinétique et métabolique complète d'une molécule est un travail long et délicat. Aussi y-a-t-il à l'heure actuelle très peu de résultats portant sur une même série chimique. Il est donc difficile de tirer des conclusions générales et de faire des corrélations entre les données de la pharmacocinétique et l'activité thérapeutique correspondante.

Aussi avons nous étudié systématiquement deux séries de dérivés et avons essayé d'établir au moins partiellement de telles relations, intéressantes pour la prévision de nouvelles molécules.

* * *

Les méthodes d'optimisation des molécules étudient en général la relation entre la structure d'un médicament et son activité pharmacologique. Très souvent on considère uniquement dans ce but l'intéraction entre la molécule et son site récepteur.

Mais l'intensité de la réponse biologique dépend en réalité de l'ensemble des phénomènes qui se produisent dans l'organisme après administration du médicament. Il ne s'agit donc pas de considérer

seulement ce qui se passe au niveau du site récepteur mais aussi comment ce médicament va du lieu d'administration à ce site. Et cela dépend des propriétés pharmacocinétiques de la molécule.

Un schéma très simplifié peut donner une idée de la chaine d'évènements ainsi impliqués :

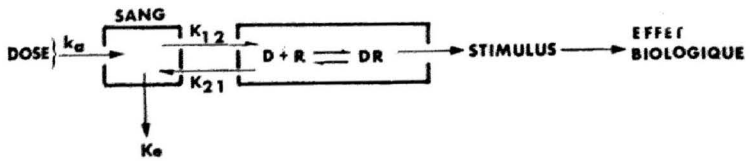

Figure 1

L'effet biologique dépendra donc au total :

— des paramètres pharmacocinétiques : K_e, K_a, K_{12}, K_{21}.

— de l'intéraction médicament-site récepteur : $D + R \rightleftharpoons DR$.

C'est en définitive une fonction très complexe de la dose administrée et des paramètres pharmacocinétiques qui régit l'activité biologique.

Les méthodes d'optimisation, comme celle de Hansch, se basent sur les propriétés physico-chimiques (coefficient de partage, répartition électronique...) pour prévoir la molécule la plus active d'une série.

Ces paramètres comme la lipohilie sont déterminés *in vitro*.

Les études pharmacocinétiques ont l'avantage de permettre d'atteindre les paramètres *in vivo*.

Dans nos études nous avons tenté d'établir un parallèle entre certaines constantes physico-chimiques (coefficient de partage, liaison aux protéines...) et les paramètres pharmacocinétiques, ce afin de faire apparaître en définitive une relation avec l'activité thérapeutique.

Deux séries de travaux ont été efectuées dans ce but.

I. Dérivés de cetoacides aromatiques

Il s'agit d'une série de molécules douées d'une activité hypolipidémiante et d'un effet hypouricémiant. Certaines d'entre elles présentent aussi des propriétés antiinflammatoires.

Les formules de quatre d'entre elles sont données sur le figure 2.

Ces molécules ont été marquées au moyen du ^{14}C à partir de l'acide itaconique et étudiées chez l'animal.

Nous avons envisagé l'influence des modifications de structure sur leur pharmacocinétique et leur métabolisme et, en particulier, les

conséquences de l'introduction d'un atome de chlore et de sa position dans la molécule.

Nous avons suivi la cinétique sanguine du pool radioactif (produit inchangé-métabolites) et aussi le taux plasmatique de la molécule non métabolisée. Les éliminations urinaire et fécale ont été déterminées.

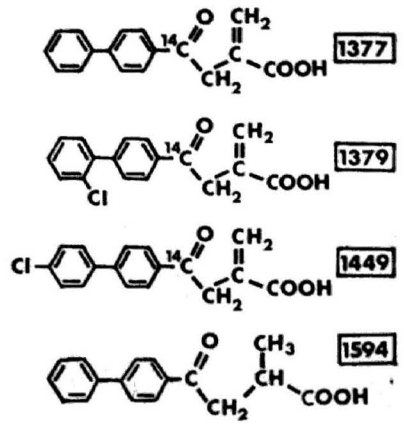

Figure 2

Les résultats ont été analysés ainsi :

1.°) *Elimination*

	Urines 96 h.	Féces 96 h.
1377	46,5 ± 4,2	50,9 ± 6,5
1379	27,4 ± 4,6	58,6 ± 7,0
1449	18,2 ± 2,1	68,9 ± 8,1

Pour le 1377 qui ne possède pas d'atome de chlore, l'élimination se produit à peu près avec la même importance par voie urinaire et par voie fécale.

Cette élimination fécale est importante car le produit est éliminé par la bile comme nous l'avons vérifié en pratiquant sur une série d'animaux des fistules choledociennes permanentes, recueilli la bile et mesuré la radioactivité.

Quand on introduit un atome de chlore, il en résulte, quelle que soit la position (ortho ou para) une augmentation du passage dans la bile.

L'excrétion biliaire d'un médicament dépend, on le sait, de diferents facteurs : masse moléculaire, solubilité dans les lipides, structure moléculaire, liaison aux protéines.

Les composés envisagés ont des masses moléculaires de l'ordre de 300 et à partir des masses de cet ordre, les substances peuvent être excrétées préférentiellement dans la bile.

L'introduction d'un atome de chlore augmente la liposolubilité et par conséquent l'élimination biliaire. D'où la supériorité du 1379 et du 1449 sur la molécule de départ.

Un fort groupe polaire existe dans ces molécules et la distance entre cette partie hydrophile et la partie lipophile est importante à considérer ; si ces deux groupes sont trop rapprochés, l'excrétion biliaire peut être diminuée.

Dans le 1379, l'introduction d'un atome de chlore favorise l'élimination biliaire mais la distance assez courte par rapport au groupement-COOH fait que cette augmentation n'est pas maximale.

Quand on passe au dérivé chloré en para (1449), on accroît la distance ce qui est favorable à l'élimination fécale qui devient effectivement plus importante.

2.°) *Cinétique sanguine*

Les cinétiques sanguines de ces trois molécules ont été déterminées chez l'animal après administration orale. Les résultats sont représentés sur les graphiques suivants où nous avons porté dans chaque cas les concentrations sanguines du produit inchangé et du pool radioactif.

On notera que le maximum d'absorption se situe vers 4-5 heures pour le 1377 et le 1379 ; pour le 1449, l'allure est différente et on note 2 maxima à 2h. et 7 h. après l'administration.

A partir de la partie correspondant à l'élimination, nous avons calcué les 1/2 vies du produit inchangé.

Elles sont les suivantes :

	1/2 vies en heures	Activité hypolipidémiante
1377	7	++
1379	4	+++
1449	10	+

Nous noterons pour le moment la durée de vie augmentée du dérivé chloré en para et aussi le parallélisme entre les courbes sanguines du produit inchangé et du pool radioactif.

Dans ce tableau, nous avons fait figurer également les résultats du test au triton qui permet une évaluation de l'activité hypolipidémiante.

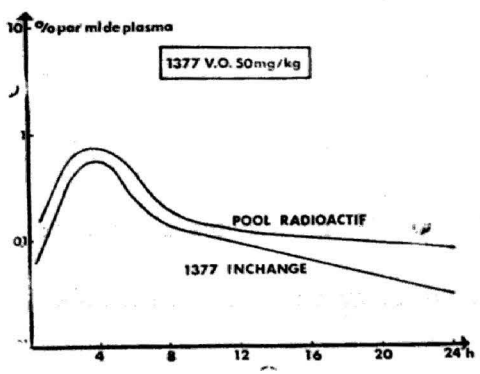

Fig. 3 (*a*)

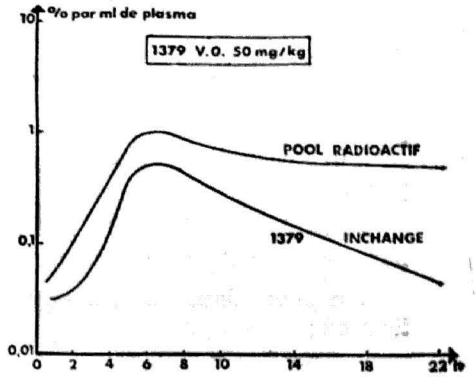

Fig. 3 (*b*)

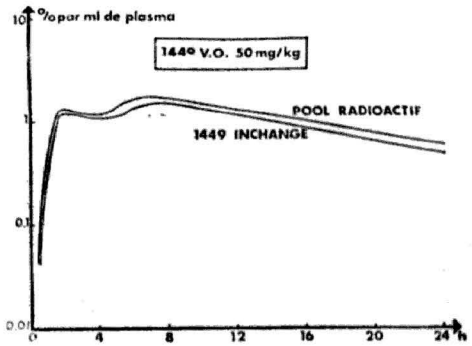

Fig. 3 (*c*)

3.°) *Metabolisme*

Pour interpréter ces résultats, qu'il s'agisse de la période biologique et de l'activité thérapeutique, il convient d'étudier le métabolisme de ces molécules.

Nour avons, dans un premier temps, sépare et dénombré par chromatographie en couche mince les métabolites des 3 molécules.

L'étude de l'hydrolyse montre la répartition suivante :

1377	75 % de sulfoconjugués
1379	75 % de »
1449	0 % de »

Ces résultats s'expliquent facilement en admettant que les dérivés de sulfoconjuguaison résultent de l'hydroxylation en para du noyau phenylchloré. Dans le cas du 1449, cette hydroxylation ne peut pas se faire, ce qui expliquerait son élimination plus lente et sa demi-vie prolongée.

Dans le cas du 1379, l'identification des métabolites a été faite par spectrométrie de masse.

On peut, dans ce cas, envisager deux grandes voies de métabolisation :

— oxydation de la chaine latérale.
— hydroxydation du noyau phenyl qui donne des sulfoconjugués.

I. OXYDATION DE LA CHAINE LATERALE

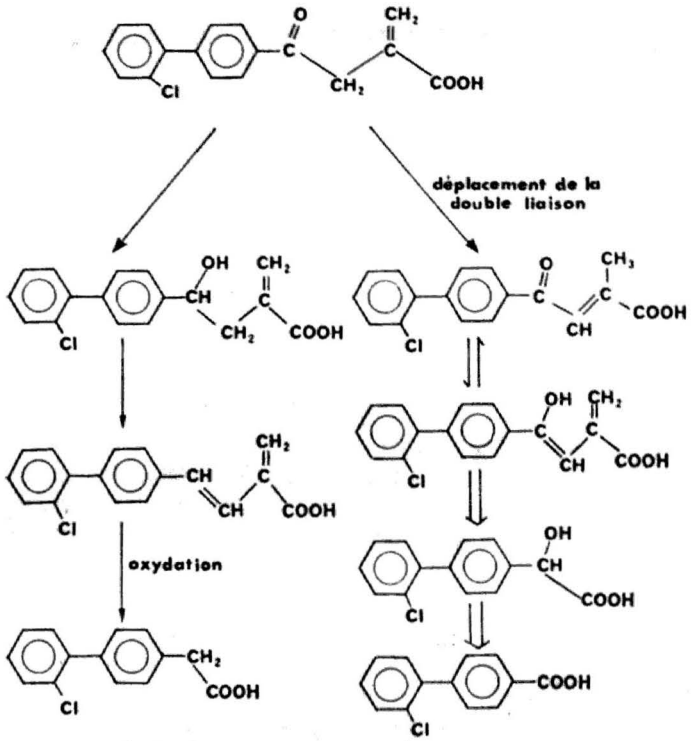

Fig. 4 - 1

L'oxydation de la chaine latérale conduit en réalité à deux métabolites. Et il est intéressant de noter que l'un a des propriétés antiinflammatoires et l'autre est hypolipidémiant. Ce qui explique que la molécule de 1379 possède ces deux propriétés.

Considérons maintenant la molécule de 1594 que nous n'avons pas encore envisagée. Elle ne renferme pas de double liaison sur la chaine latérale. Or, la présence de cette double liaison qui bascule est indispensable pour la formation du métabolite II. Le 1594 sera donc essentiellement antiinflammatoire.

C'est là un résultat fort intéressant en ce qui concerne le mécanisme d'action de ces médicaments.

Il reste encore bien de points à élucider, expliquer en particulier les différences d'activité des 3 composés manifestés par le test au triton.

II. HYDROXYDATION DU NOYAU PHENYL

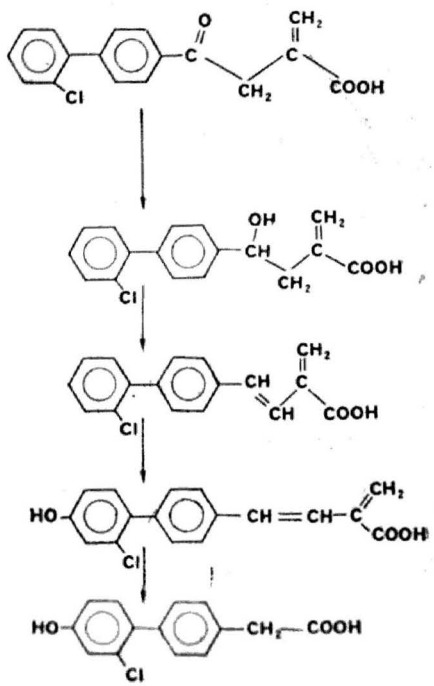

Fig. 4-2

II. Étude des dérivés de la cresotinamide

Toujours dans les mêmes perspectives, nous avons entrepris l'étude pharmacocinétique d'une série d'amides cresotiniques, dérivés de la cresotinamide. Ces molécules ont des propriétés myorelaxantes et anticonvulsivantes et peuvent agir comme agent potentialisateur.

Leurs formules sont les suivantes :

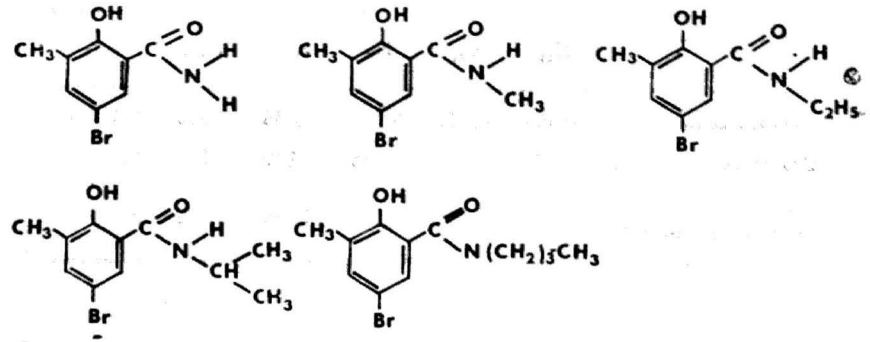

Fig. 5

1.°) Pour la commodité de l'exposé, nous discuterons dans un premier temps sur les trois premiers termes de la série : cresotinamide, bromocresotinamide, N-methyl-bromocresotinamide.

L'étude du métabolisme de ces molécules montre qu'elles donnent naissance à deux métabolites principaux correspondant respectivement à une conjuguaison sur la fonction phenol et une acetylation au niveau de l'amide :

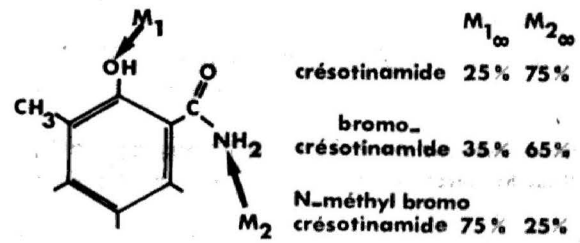

Fig. 6

Les modèles pharmacocinétiques ont été établis et nous avons dans chaque cas déterminé les paramètres suivants :

— constante globale de métabolisation K_M.
— constante partielle de métabolisation K_{M_1} et K_{M_2}.
— constante de transfert K_{12} et K_{21}.
— demi-vie biologique T 1/2.

Les résultats sont les suivants :

	K_{12}	K_{21}	K_M	K_{M1}	K_{M2}	$T_{1/2}$
Crésotinamide	0,050	0,073	0,115	0,086	0,086	8,8 min
Bromocrésotinamide	0,071	0,130	0,188	0,122	0,122	16
N-methyl bromocrésotinamide	0,061	0,055	0,102	0,026	0,026	23

La constante globale de métabolisation K_M est nettement augmentée par l'introduction d'un atome de brome. Par contre, la fixation du radical methyl sur la fonction amide diminue cette constante ce qui est évident car on bloque ainsi une des voies de métabolisation comme le montre d'ailleurs la faible valeur de K_{M2}.

En ce qui concerne la conjuguaison sur le groupement OH, il y augmentation quand on passe à la bromo et à la N-methyl cresotinamide. Ces composés montrent donc des propriétés potentialisatrices sur les médicaments métabolisés par conjuguaison.

Considérons, d'autre part, les paramètres pharmacocinétiques de transfert ou plus exactement leur rapport K_{12}/K_{21} qui traduit la distribution vers les tissus. Ce rapport est plus élevé pour la N methyl (1,1 contre 0,68 et 0,54) : le passage vers le compartiment périphérique est donc plus important avec ce composé, ce qui augmente ses possibilités d'activité.

Effectivement, en considérant par exemple l'action antagoniste sur la narcose provoquée par les barbituriques, on trouve :

Bromocresotinamide à la dose de 100 mg/kg : + 30 %
N methylcresotinamide » » » : + 130 %

D'autre part, l'effet de réservoir dû au compartiment périphérique est plus faible pour la bromocresotinamide ce qui joint à une constante globale de métabolisation plus élevée conduit à une durée de vie courte.

2.°) Considérons maintenant l'ensemble des résultats obtenus avec les 5 dérivés de la cresotinamide ; ils sont tous bromés et portent des substitutions différentes sur la fonction amide : methyl, ethyl, isopropyl, butyl, octyl.

Nous avons rassemblé dans le tableau suivant les principaux paramètres qui nous intéressent :

	Urines	Féces	$T_{1/2}$ en min	P	Log P	K
Crésotinamide	84,8 ± 4,0	4,0 ± 2,7	8,8	111	2,04563	$1,4 \times 10^3$
Bromocrésotinamide	90,9 ± 3,1	4,9 ± 0,8	16	587	2,76072	$4,2 \times 10^4$
N-Méthyl	79.5 ± 6,1	11,1 ± 2,0	23	3266	3,51402	$7,1 \times 10^5$
N-Ethyl	75,0 ± 4,1	17,5 ± 1,1	60	3684	3,56632	$7,3 \times 10^5$
N-Isopropyl	69,9 ± 3,7	20,2 ± 2,1	60	15640	4,19424	$8,5 \times 10^5$
N-Butyl	44,4 ± 3,4	50,1 ± 3,1		22908	4,35996	$1,2 \times 10^5$
N-Octyl	5,0 ± 1,0	89,2 ± 4,0		$> 10^5$		

Etudions chacun de ces paramètres et leur évolution suivant les substitutions.

a) *Elimination.*

Le phénomène est extrêmement net. L'élimination fécale va en augmentant au fur et à mesure de l'allongement de la chaine latérale : cet accroissement est modéré pour les premiers termes puis pour le N-butyl il y a une augmentation brutale (50 %) et on obtient 89 % pour le N-octyl.

Il s'agit d'une élimination biliaire qui augmente avec la longueur de la chaine et donc avec la lipophilie (coefficient de partage P).

b) *Liaison aux protéines (K).*

Nous avons étudié la liaison des dérivés de la cresotinamide avec la serum albumine, par la méthode de l'équilibre de dialyse et en utilisant pour les mesures les molécules marquées. Nous nous sommes placés dans les conditions optimales et avons effectué de nombreuses déterminations pour chaque système. Les résultats expérimentaux ont été dépouillés par la méthode de Scatchard.

On sait que la liaison hydrophobe joue un grand rôle dans l'interaction des protéines avec des médicaments neutres ; elle est également impliquée de façon significative dans la liaison des médicaments ionisés.

Pour faire apparaitre cette correlation entre la lipophilie et la constante d'association K, nous avons tracés la courbe log K = F (log. P).

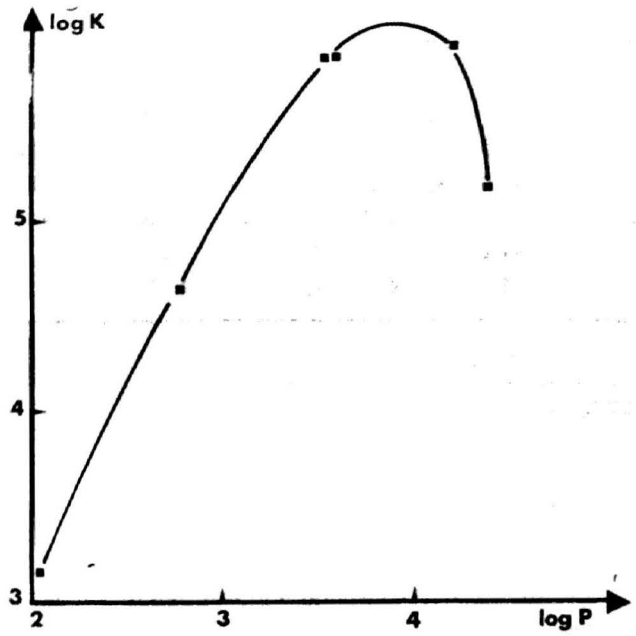

Fig. 8

Pour les trois premiers termes, la constante K augmente régulièrement avec la liposolubilité. Puis cette constante passe par un plateau pour le dérivé ethyl et pour l'isopropyl et diminue ensuite.

On peut penser qu'à partir d'une certaine longueur de chaine et d'une certaine structure, l'effet de lipophilie n'est plus le seul à intervenir. L'encombrement stérique évidemment important pour l'isopropyl et le butyl peut alors abaisser de façon significative la valeur relative de la liaison.

On notera dans le même ordre idée que la demi-vie biologique a, elle aussi, tendance à se stabiliser à un palier à partir du N-ethyl. Cette évolution est à mettre en parallèle avec de la constante d'association K.

c) *Activité thérapeutique.*

Ces molécules présentent un assez large spectre d'activité. Elles ont en général une action sur le système nerveux central et certaines d'entre elles agissent comme potentialisateurs.

Nous donnons à titre d'exemple les résultats du test de narcose barbiturique dans lequel on mesure les variations du temps de sommeil ; ces variations sont exprimées en pourcentage. Nous avons également fait figurer un test des propriétés myorelaxantes, le temps de redressement.

	Narcose barbiturique % variation	Réflexe redressement de 50 mg/kg
Bromoc ésotinamide	++ 28	—
N-méthyl	+ 129	560
N-ethyl	+ 213	560
N-butyl	+ 199	1000
Isobutyl	+ 218	1000

Il faut noter au début de cette discussion que si on pratique une substitution sur le groupement phenol OH, l'activité disparait comme cela a été vérifié en methylant le bromocresotinamide et la N-ethyl-chlorocresotinamide.

Il semble donc que cette fonction joue un rôle dans le mácanisme d'action de ces médicaments.

Par contre, la substitution sur l'azote ne parait pas avoir une influence profonde sur l'activité de ces molécules.

En effet, malgré la non concordance parfaite des deux tests d'action, il apparait cependant que dans les deux essais, on observe à partir du dérivé N-ethyl un plafonnement ou même une chute de l'activité.

L'allure de cette évolution parait donc en accord avec celle des demivies et des constantes d'association.

En ce qui concerne les constantes de liaison, on admet généralement qu'il ne peut y avoir un effet appréciable de la liaison sur la distribution du médicament et donc sur son activité que lorsqu'elle est supérieure à 10^4.

Dans notre série, nous n'avons une baisse díactivité que pour des valeurs de l'ordre de 10^5.

Contrairement à une opinion courante, liaison aux protéines plasmatiques ne signifie pas obligatoirement baisse de la disponibilité et donc de l'activité du médicament.

Cette étude de liaison a été faite pour montrer l'influence de l'asso-

ciation de la molécule à une protéine vectrice. On ne saurait évidemment en déduire les possibilités d'interaction au niveau du site récepteur. Mais l'ensemble des phénomènes observés peut laisser supposer que l'intéraction au niveau des sites, bien que favorisée par la lipophilie de plus en plus grande dans la série, est limitée à partir d'un certain encombrement de la chaine.

An. Real Acad. Farm. 1979, 45: 213-230

El origen y la evolución de la resistencia a los antibióticos

por

JOSE M. ORTIZ MELON

Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de Santander

1. Aspectos históricos y dimensiones del problema

En la actualidad, es bien conocido el hecho de que mientras que el empleo de sulfamidas y antibióticos ha tenido una profunda influencia en la incidencia y control de las enfermedades infecciosas, ha creado también algunos problemas. Uno de ellos es la aparición de organismos resistentes a las mismas sustancias utilizadas para combatirlos.

Aunque el fenómeno de la resistencia a antibióticos fue observado hace ya varias décadas, casi simultáneamente al descubrimiento de los primeros antibióticos (1), puede decirse que sólo surgió como problema sanitario coincidiendo con la generalización del uso de sulfamidas y antibióticos como agentes terapéuticos. Estudios epidemiológicos llevados a cabo en el Japón hace treinta años, indicaron que mientras que al final de la 2.ª Guerra Mundial las sulfamidas eran muy eficaces en la lucha contra epidemias de disenteria bacilar hacia 1952, un 80 por 100 de las *Shigellas* aisladas de estos pacientes eran resistentes a sulfonamida (2). Posteriormente, la introducción de Estreptomicina, Tetraciclina y Cloranfenicol en los años 50, fue seguida de su empleo casi masivo en aquellas islas, dando lugar a la aparición de las primeras estirpes resistentes a estos antibióticos. En un principio, estas estirpes eran sólo resistentes a uno de los antibióticos mencionados. Sin embargo, a partir de 1957 un número significativo de *Shigellas* mostraban ya lo que se ha venido a llamar *resistencia múltiple*, es decir resistencia simultánea y elevada a varios antibióticos de mecanismo de acción totalmente diferente (3).

En el mundo occidental, las primeras descripciones sobre la resistencia múltiple fueron realizadas por Datta en Inglaterra, en 1962, en estirpes de *Salmonella thiphymurium*. Lebeck en Alemania y Chabbert en Francia describieron en la misma época la frecuencia de *E. coli* y otras Enterobacterias multiresistentes, y varios investi-