

Los inhibidores de la tirosina quinasa (TKIs) constituyen uno de los tratamientos contra el cáncer más utilizados en las últimas décadas. Los TKIs presentan grandes ventajas frente a terapias más clásicas (i. e. quimioterapia, radioterapia) por su elevada selectividad, ya que únicamente se dirigen a las células cancerosas para bloquear la actividad tirosina quinasa, inhibiendo su crecimiento descontrolado y por tanto la consiguiente aparición de tumores. No obstante, estos fármacos tras absorber luz solar, pueden generar daño a las principales dianas moleculares (ADN, lípidos y proteínas) dando lugar a reacciones de fotosensibilización, las cuales se manifiestan en forma de lesiones cutáneas, fotodermatitis, y en última instancia desarrollando cáncer de piel. A pesar de que muchos fármacos de esta familia contienen un cromóforo en su estructura que les permite absorber luz y, por tanto, podrían generar reacciones de fotosensibilización, existen pocos estudios sobre el mecanismo de reacción asociado. Así, en nuestro grupo se investigaron los mecanismos moleculares tanto químicos como biológicos de dos TKIs como son imatinib (IMT) y lapatinib (LAP). Por tanto, conocer la fotorreactividad del fármaco en medio biológico es clave para entender los mecanismos por los que se genera el daño fotoinducido. Además, se estableció una correlación directa entre el comportamiento fotofísico de LAP y de sus principales metabolitos con el daño fotobiológico que generan. Para ello, se utilizaron distintas técnicas espectroscópicas como son la fluorescencia y la absorción transitoria, las cuales son de gran utilidad por ser altamente sensibles, ya que se pueden detectar las especies transitorias que podrían ser las responsables de la fotosensibilización.

Con estos antecedentes, y habiendo estudiado recientemente la foto(geno)toxicidad que puede provocar el TKI gefitinib (GFT) y sus principales metabolitos fotoactivos (GFT-M1 y GFT-M2), se ha decidido llevar a cabo un estudio completo sobre la fotorreactividad de éstos tanto en disolución como en medio proteico. Además, también se ha estudiado la unión ligando@proteína, así como las interacciones que tienen lugar en el complejo supramolecular tras la absorción de luz UV-A, con el objetivo final de poder entender los mecanismos moleculares responsables del daño fotoinducido a biomoléculas.

En primer lugar, se han estudiado las propiedades fotofísicas de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en disolución orgánica, utilizando disolventes de distintas polaridades. De esta forma, se han caracterizado las principales especies transitorias formadas, así como los procesos fotoinducidos que tienen lugar tras excitar con luz UV-A en disolución. En general, tanto para el fármaco como para los metabolitos, se observó una fuerte dependencia de las propiedades fotofísicas con la polaridad del medio. Así, en disolventes apolares se forman principalmente estados excitados localizados (LE) de naturaleza singlete, los cuales son los precursores directos de los estados excitados triplete. Sin embargo, en medios más polares, inicialmente se forman estados LE, los cuales evolucionan muy rápidamente hacia la formación de estados de transferencia de carga intramolecular (ICT), que posteriormente formarán estados excitados triplete. Estos estados excitados se caracterizaron completamente mediante distintos experimentos fotofísicos: desactivación por oxígeno molecular y fotosensibilización con dadores o aceptores adecuados.

Seguidamente, se investigó el comportamiento fotofísico del fármaco y de sus metabolitos en medio biológico, utilizando para ello dos de las proteínas transportadoras más importantes y abundantes en el torrente sanguíneo, como son la albúmina sérica y la  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida, ambas de origen humano (HSA y HAG, respectivamente). En general, se observó un gran aumento de la emisión del fármaco y de sus metabolitos unidos a la

proteína en comparación con la fluorescencia detectada cuando están libres en disolución acuosa. Dicho aumento viene dado como consecuencia de las restricciones en el interior de la proteína para que se dé la relajación conformacional de GFT y de sus metabolitos. En relación a las interacciones con la proteína, se observaron grandes diferencias en el comportamiento fotofísico de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en el interior de éstas. Así, para GFT@proteína se observó únicamente la formación de estados excitados LE; a partir de estos puede tener lugar un proceso de transferencia electrónica desde el triptófano o la tirosina presentes en la cavidad de la proteína a LE-1GFT\*. Sin embargo, en el caso de GFT-M1@HSA, se reveló un proceso de transferencia de protón fotoinducida para formar especies de tipo fenolato en el estado excitado. No obstante, este proceso tiene mucha menos importancia en los complejos GFT-M1@HAG, donde se observó mayoritariamente emisión desde estados LE. Por el contrario, la excitación de GFT-M2@HSA genera principalmente estados LE, mientras que para GFT-M2@HAG se forman en mayor medida especies tipo fenolato. Cabe destacar que en el interior de la proteína no se detectó la formación de estados excitados triplete en ningún caso, lo cual tiene implicaciones biológicas puesto que el mecanismo de fototoxicidad asociado al fármaco y a sus metabolitos ha de ser únicamente de tipo I.

Estudios adicionales mediante espectroscopía de fluorescencia y de modelización molecular, permitieron conocer con detalle el sitio de unión preferente del fármaco y de sus metabolitos en las proteínas, así como la conformación adoptada y las interacciones con los aminoácidos. Para el caso de HSA, se observó que el sitio de unión preferente de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 es el sitio 3. Además, se calcularon las constantes de unión (KB) de los tres ligandos para ambas proteínas, obteniéndose valores similares entre sí. En cuanto a las interacciones con los aminoácidos del sitio de unión 3, se observaron comportamientos diferentes para GFT, GFT-M1 y GFT-M2. Puesto que GFT-M1 es un fenol, puede formar puentes de hidrógeno con la valina 116, lo que posibilita la existencia de procesos de transferencia de protón fotoinducida y, por tanto, la generación de especies tipo fenolato. Por el contrario, a pesar de que GFT-M2 también es un fenol, éste interacciona con HSA de modo distinto, impidiendo que se formen especies fenolato y favoreciendo la formación de estados LE. Sin embargo, en HAG ocurre lo contrario; así, GFT-M2 se orienta de forma que el fenol interacciona formando un puente de hidrógeno con la histidina 97, permitiendo la transferencia de protón fotoinducida y, por tanto, la generación de especies tipo fenolato.

Por tanto, se ha conseguido estudiar y entender el comportamiento fotofísico de GFT y de sus metabolitos fenólicos en disolución orgánica y en el interior de las proteínas transportadoras HSA y HAG. Además, se han caracterizado completamente las especies transitorias generadas y descrito en detalle los procesos que ocurren tras la interacción de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 con luz UV-A, pudiéndose así establecer una correlación entre el comportamiento fotofísico observado y el potencial fototóxico de los tres compuestos estudiados.