

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Departamento de Química

**Instituto Universitario Mixto de Tecnología Química
(UPV-CSIC)**



**PROPIEDADES FOTOQUÍMICAS DE FÁRMACOS
QUE CONTIENEN EL CROMÓFORO NAFTALENO EN
MEDIOS MICROHETEROGÉNEOS**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Eduarne Nuin i Plá

Dirigida por:

Prof. Miguel A. Miranda Alonso

Dra. Inmaculada Andreu Ros

Valencia, 2013

D. MIGUEL ÁNGEL MIRANDA ALONSO, Profesor Catedrático de Química de la Universidad Politécnica de Valencia, y Dña. INMACULADA ANDREU ROS, Investigadora SNS “Miguel Servet” en el Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital La Fe.

CERTIFICAN: Que la presente tesis doctoral, titulada: “**Propiedades fotoquímicas de fármacos que contienen el cromóforo naftaleno en medios microheterogéneos**”, ha sido desarrollada por EDURNE NUIÑE i PLÁ, bajo su dirección, en el Instituto Universitario Mixto de Tecnología Química (UPV-CSIC) de la Universidad Politécnica de Valencia.

D. Miguel A. Miranda Alonso

Dña. Inmaculada Andreu Ros

Omnia consecutus eris virtute duce comite fortuna.

Todo lo habrás de conseguir siendo el esfuerzo tu guía, la suerte tu compañera.

Cicerón.

A mis padres

A Gonzalo

Cuando se llega al final de una tesis doctoral, auténtica maratón de esfuerzos, cansancios y autosuperación, es cuando una se para a pensar en medio de su satisfacción que esta carrera no la ha realizado sola y es más, no la ha recorrido únicamente con sus solas fuerzas. Tiene en su memoria y en su corazón a todas aquellas personas que le han ayudado a alcanzar esta meta. De muchas de ellas he aprendido (y aprehendido) valiosas lecciones y técnicas en el ámbito académico y de investigación -stricto sensu-, pero además están las indefinidas aportaciones de la rica pluralidad de los que circulan por los pasillos, laboratorios y despachos del ITQ que me han ido mostrando la diversidad de actitudes que se puede tener ante la ciencia, el trabajo, las dificultades y los aciertos, en definitiva, ante la vida. En el transcurso de los meses y días esto me ha servido de catalizador a todo lo anterior de modo que la síntesis resultante de tantas personas, conocimientos, idas y venidas al Instituto, ha contribuido de forma adecuada en mi búsqueda de la felicidad.

Por todo lo anterior, este apartado, aunque ha de ser en algún punto muy concreto, lleva en su urdimbre unos hilos que en cada metro de tela aparece la palabra gratitud, tejida en diversos colores y por qué. Estoy agradecida a muchas personas. Inevitablemente, al citarlas me olvidaré de alguien. Espero me disculpe.

En primer lugar, quiero agradecer a la dirección y la gerencia del Instituto Universitario Mixto de Tecnología Química (ITQ), la oportunidad única que me han ofrecido. Han puesto a mi disposición todos los medios e instalaciones para que pueda desarrollarme como investigadora. Me siento afortunada de que hayan confiado en mí.

A mis directores de tesis Miguel Ángel Miranda e Inmaculada Andreu. Gracias por su dedicación y generosidad en todos los aspectos que han rodeado esta investigación. Sin su ayuda no hubiera sido posible finalizar con éxito el trabajo que aquí se expone. Dejan huella y estilo.

A la Red de Investigación de Reacciones Adversas a Alérgenos y Fármacos (RIRAAF) dentro del programa RETICS del Instituto de Salud Carlos III, por la financiación aportada que ha hecho posible la realización de esta tesis.

A mis compañeros de grupo y de laboratorio que han estado a lo largo de la tesis conmigo ofreciéndome su apoyo y comprensión: Patri, Jana, Faber, Fifi y Sonia. Me bastaba saber que estaban a mi lado, con sus miradas, sus silencios, sus risas; en los congresos, en los viajes, las cenas. Situaciones y vivencias de todos los colores. No olvido a Giacomo, Vicky, Paula, Mireia, Miguel, Gema, Virginie, Chelo, Marisa y Paco. A los compañeros del departamento: Pavel, Carlos, Nacho, Raúl, Rafa, Dani, Neus, Chelo y Rosa así como a Paula y Dolors con cuya animosa ayuda siempre he contado.

Extensa es la lista de todos aquellos con los que he compartido pasillos, pausas y proyectos durante este quinquenio: Raquel, Guillermo, Judit, Paula, Cristina, Amparo, Pedro. A Maike que tanto me ha ayudado en el formato de esta tesis. Son todos los que están aunque no están todos los que fueron.

A Gonzalo por su compromiso total conmigo, por la esperanza de cada día y por el futuro que andaremos juntos. En la vida, codo a codo, somos mucho más que dos.

A mis padres que siempre creyeron en mí y son ejemplos de superación y temple. Día a día han estado impulsándome en los momentos más difíciles y gracias a ellos he llegado hasta hoy. ¡Esta tesis también es suya!

Gracias a la vida que me ha dado tanto...

Eduarne

Abreviaturas y símbolos

A	Absorción
AAG	α -glicoproteína ácida
AAGB	α -glicoproteína ácida bovina
AAGH	α -glicoproteína ácida humana
AC	Ácido cólico
Arg	Arginina
AS	Albúmina sérica
ASB	Albúmina sérica bovina
ASH	Albúmina sérica humana
CaR	Receptor de calcio
CDCl₃	Cloroformo deuterado
Ch	Colesterol
CI	Conversión interna
CIN	Cinacalcet
CINH⁺	Cinacalcet protonado
CIS	Cruce intersistemas
C.M.C.	Concentración micelar crítica
C_{sat}	Concentración de saturación
C_{sc}	Concentración de solubilización crítica
Cys	Cisteína
DFT	Teoría del Funcional de la Densidad
DLS	Dispersión de luz dinámica
δ	Desplazamiento químico
ϵ	Constante dieléctrica
E_s	Energía de singlete
E_T	Energía de triplete
EX	Exciplejo
EXC	Excímero

F	Fluorescencia
ϕ_{CIS}	Rendimiento cuántico de cruce intersistemas
FDL	Fotólisis de destello láser
ϕ_{F}	Rendimiento cuántico de fluorescencia
ϕ_{Δ}	Rendimiento cuántico de oxígeno singlete
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster
His	Histidina
IFF	Interacción fármaco-fármaco
J	Constante de acoplamiento
K_B	Constante de asociación
k_{CIS}	Constante de velocidad de cruce intersistemas
k_{CI}	Constante de velocidad de conversión interna
k_F	Constante de velocidad de fluorescencia
k_{NR}	Constante de velocidad de desactivación no radiante
k_P	Constante de velocidad de fosforescencia
k_q	Constante de desactivación
k_{Sq}	Constante de desactivación de singlete
k_{Tq}	Constante de desactivación de triplete
k_{TP}	Constante de velocidad de transferencia de protón
k_{q,dis}	Constante de desactivación en disolución
k_{q,MM}	Constante de desactivación en micelas mixtas
L	Lecitina
λ	Longitud de onda
MM	Micelas mixtas
NAB	Nabumetona
NP	Naftaleno
NPX	Naproxeno
NPXMe	Éster metílico del naproxeno

P	Fosforescencia
PBS	Disolución tamponada de fosfato
ppm	Partes por millón
PPN	Propranolol
PTH	Hormona paratiroidea sérica
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN-¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono
RMN-¹H	Resonancia magnética nuclear de protón
RV	Relajación vibracional
S	Singlete
SB	Sal biliar
τ_F	Tiempo de vida de fluorescencia
τ_T	Tiempo de vida de triplete
T	Triplete
TE	Transferencia de energía
TEI	Transferencia electrónica
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
TETT	Transferencia de energía triplete-triplete
TNF	Factor de necrosis tumoral
TP	Transferencia de protón
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
ua	Unidades arbitrarias
UV-Vis	Ultravioleta visible

Índice

Capítulo 1. Introducción	1
1.1. Procesos fotoquímicos y fotofísicos.....	3
1.1.1.- Transferencia electrónica y formación de exciplexo.....	7
1.1.2.- Transferencia de energía.....	9
1.1.3.- Transferencia de protón.....	11
1.1.4.- Formación de excímero.....	11
1.2. Ambientes microheterogéneos.....	12
1.2.1.- Las proteínas.....	14
1.2.2.- Albúmina sérica.....	17
1.2.2.1.- Función de la albúmina sérica.....	18
1.2.2.2.- Estructura general de la albúmina sérica.....	19
1.2.2.3.- Interacción con sustratos.....	22
1.2.3.- α -Glicoproteína ácida.....	23
1.2.3.1.- Función de la α -glicoproteína ácida.....	24
1.2.3.2.- Estructura general de la α -glicoproteína ácida.....	25
1.2.3.3.- Interacción con sustratos.....	26
1.2.4.- Interacciones competitivas.....	28
1.2.5.- Micelas mixtas.....	31
1.2.5.1.- Formación de las micelas mixtas.....	34
1.2.5.2.- Estructura de las micelas mixtas.....	35
1.2.5.3.- Interacción con sustratos.....	37

Capítulo 2. Objetivos	39
2.1. Objetivo general	41
2.2. Objetivos concretos	43
Capítulo 3. Fotofísica del (R)-cinacalcet y su interacción con la albúmina sérica humana (ASH)	45
3.1. Introducción.....	47
3.2. Resultados y discusión.....	49
3.2.1.- Propiedades de absorción UV-Vis	49
3.2.2.- Medidas de fluorescencia	49
3.2.3.- Estudio por fotólisis de destello láser.....	55
3.2.4.- Fotofísica de los complejos fármaco / proteína en medio acuoso neutro.....	59
3.3. Conclusiones.....	64
3.4. Procedimiento experimental	65
3.4.1.- Materiales y disolventes	65
3.4.2.- Medidas de fluorescencia	66
3.4.3.- Medidas de fotólisis de destello láser	67
3.4.4.- Medidas de oxígeno singlete	68
Capítulo 4. Determinación de la distribución de fármaco en sistemas binarios albúmina sérica/α-glicoproteína ácida (AS/AAG)	71
4.1. Introducción.....	73

4.2. Resultados y discusión.....	75
4.2.1.- Unión de naproxeno (NPX) a proteínas	76
4.2.2.- Unión de propranolol (PPN) a proteínas	82
4.2.3.- Unión de cinacalcet (CIN) a proteínas	86
4.3. Conclusiones.....	91
4.4. Procedimiento experimental	91
4.4.2.- Medidas de fotólisis de destello láser	92
4.4.3.- Síntesis del (S)-cinacalcet	93
4.4.3.1.- Caracterización.....	95
4.5. Anexo Capítulo 4.....	96
4.5.1.- Espectros ^1H y ^{13}C -RMN.....	96
Capítulo 5. Interacciones fármaco -fármaco en α-glicoproteína ácida (AAG).....	99
5.1. Introducción.....	101
5.2. Resultados y discusión.....	104
5.2.1.- Medidas de fosforescencia	104
5.2.2.- Estudio por fotólisis de destello láser.....	105
5.3. Conclusiones.....	111
5.4. Procedimiento experimental	112
5.4.1.-Materiales y disolventes	112
5.4.2.- Medidas de fosforescencia	112
5.4.3.- Medidas de fotólisis de destello láser	112
5.4.4.- Cálculos teóricos	113

Capítulo 6. Encapsulación de fármacos en micelas mixtas . 115

6.1. Introducción..... 117

6.2. Resultados y discusión..... 119

 6.2.1.- Preparación de micelas mixtas 119

 6.2.2.- Medidas de fluorescencia 120

 6.2.3.- Estudio por fotólisis de destello láser..... 125

6.3. Conclusiones..... 128

6.4. Procedimiento experimental 129

 6.4.1.- Materiales y disolventes 129

 6.4.2.- Preparación de micelas mixtas 129

 6.4.3.- Medidas de fluorescencia 130

 6.4.4.- Medidas de fotólisis de destello láser 130

 6.4.5.- Imágenes de microscopía electrónica de transmisión..... 131

 6.4.6.- Medidas de dispersión de luz dinámica 131

Capítulo 7. Instrumentación 133

7.1. Instrumentación general 135

7.2. Instrumentación fotoquímica..... 136

Bibliografía..... 139

Conclusiones..... 155

Resúmenes 161

Contribuciones a congresos 175

Publicaciones 179

Capítulo 1. Introducción

1.1. Procesos fotoquímicos y fotofísicos

La luz tiene un papel fundamental sobre los seres vivos. La energía de la radiación ultravioleta y visible (UV-Vis) del sol da lugar a fenómenos que permiten la continuidad de la vida terrestre y, muy probablemente, también fue protagonista de su desarrollo y evolución. La influencia que tiene la luz es fundamental, tanto en forma directa como indirecta, para el progreso de la vida sobre la tierra. El ejemplo más conocido es el proceso de fotosíntesis que realizan las plantas, que utilizan la luz solar para formar carbohidratos y oxígeno.

La fotoquímica molecular es la disciplina científica que estudia las reacciones químicas inducidas por la luz. Los procesos fotoquímicos se inician tras la absorción de radiación UV-Vis (200-800 nm). Esta energía no se distribuye al azar en la molécula sino que es absorbida selectivamente por grupos cromóforos (cuyos electrones se encuentren en orbitales n o π , como dienos, grupos carbonilo, aromáticos, etc). Los espectros de absorción y emisión de una molécula proporcionan información relevante sobre la estructura, la energía y la dinámica de los estados electrónicos excitados. Su estudio puede ayudar a comprender e interpretar la reactividad fotoquímica y las propiedades fotofísicas de los compuestos.

Una molécula, tras absorber un fotón, alcanza un estado electrónicamente excitado que es inestable respecto al estado fundamental. Para liberarse del exceso de energía y consecuentemente regresar a su estado fundamental, puede tomar diversos caminos que, de acuerdo con el resultado final, se pueden dividir en dos grupos: procesos fotoquímicos o procesos fotofísicos.

- Los **procesos fotoquímicos** son las transformaciones que puede experimentar una molécula desde su estado electrónico excitado para originar estructuras con una constitución o configuración diferente a la correspondiente al estado inicial.
- Los **procesos fotofísicos** son aquellos que tan sólo involucran cambios en los estados cuánticos de las moléculas y no en su naturaleza química. Son transiciones en las que se producen interconversiones entre estados excitados o entre un estado excitado y el estado fundamental. Estos procesos pueden ser radiantes o no radiantes atendiendo a si durante la desactivación se produce la emisión de radiación electromagnética o no.

Las transiciones radiantes son “transiciones verticales” e implican un cambio en la energía total de la molécula debido a la absorción o la emisión de un fotón. Las transiciones no radiantes involucran conversiones de un estado a otro sin cambio de energía en la molécula.

Entre los procesos radiantes más habituales podemos citar:

- Absorción (A): caracterizada por un coeficiente de absorción molar (ϵ , constante relacionada con el área de incidencia del cromóforo y la probabilidad de que se produzca la absorción a una λ determinada). La absorción está asociada a transiciones electrónicas entre diferentes niveles energéticos en ciertos grupos de la molécula. Estas pueden ser transiciones permitidas (singlete-singlete, $S_0 + h\nu \rightarrow S_1$) o prohibidas (singlete-triplete, $S_0 + h\nu \rightarrow T_1$) por la regla del espín.

- Fluorescencia (F): se trata de una transición entre estados con la misma multiplicidad de spin y por tanto permitida. La desactivación de la especie desde el estado excitado singlete de menor energía S_1 , hasta el estado fundamental S_0 ($S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$) implica la emisión de un fotón. Habitualmente se produce de manera rápida, en el rango de los picosegundos a los nanosegundos y está caracterizada por una constante de velocidad k_F .
- Fosforescencia (P): se trata de una transición entre estados de diferente multiplicidad de spin, es decir, teóricamente prohibida, en la que la especie excitada se suele desactivar desde el primer estado excitado triplete al estado fundamental ($T_1 \rightarrow S_0 + h\nu$) con la consiguiente emisión de un fotón. Es una emisión de menor intensidad que la fluorescencia, ocurre más lentamente y está caracterizada por una constante de velocidad k_P .

Entre los procesos no radiantes más comunes se encuentran:

- Conversión interna (CI): transiciones permitidas entre dos estados de la misma multiplicidad en las que la molécula excitada pasa de un estado electrónico más alto a otro más bajo, ocasionando una serie de relajaciones vibracionales sin emisión de radiación. La efectividad de la CI depende de la diferencia de energía entre los estados. A menor diferencia de energía entre el estado inicial y final, mayor es la probabilidad de que se dé la CI. Ésta se caracteriza por una constante de velocidad k_{CI} .

- Cruce intersistemas (CIS): transiciones prohibidas entre dos niveles vibracionales isoenergéticos pertenecientes a estados electrónicos de diferente multiplicidad (por ejemplo, $S_1 \rightarrow T_1$ ó $T_1 \rightarrow S_0$), caracterizadas por una constante de velocidad k_{CIS} . El CIS está favorecido si los niveles vibracionales de los dos estados electrónicos se solapan o por la presencia de átomos pesados (como el Pb o el Br) que incrementan mucho la probabilidad de que se dé esta transición.
- Relajación vibracional: transmisión de un exceso de energía de un nivel vibracional excitado hasta el correspondiente de menor energía de un estado electrónico. El exceso de energía vibracional se transfiere gradualmente a moléculas de disolvente vecinas al ir colisionando éstas con la molécula excitada.

En la Figura 1.1 se representa el diagrama de Jablonsky donde se muestran las principales rutas de desactivación que un cromóforo puede seguir tras absorber un fotón. Los tiempos característicos de los principales procesos fotofísicos se recopilan en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Tiempos característicos de los principales procesos fotofísicos.

Proceso fotofísico	Tiempo (s)
Absorción	10^{-15}
Relajación vibracional	10^{-12} - 10^{-10}
Tiempo de vida del estado excitado S_1	10^{-10} - 10^{-7}
Conversión interna	10^{-11} - 10^{-9}
Cruce intersistemas	10^{-10} - 10^{-8}
Tiempo de vida del estado excitado T_1	10^{-6}

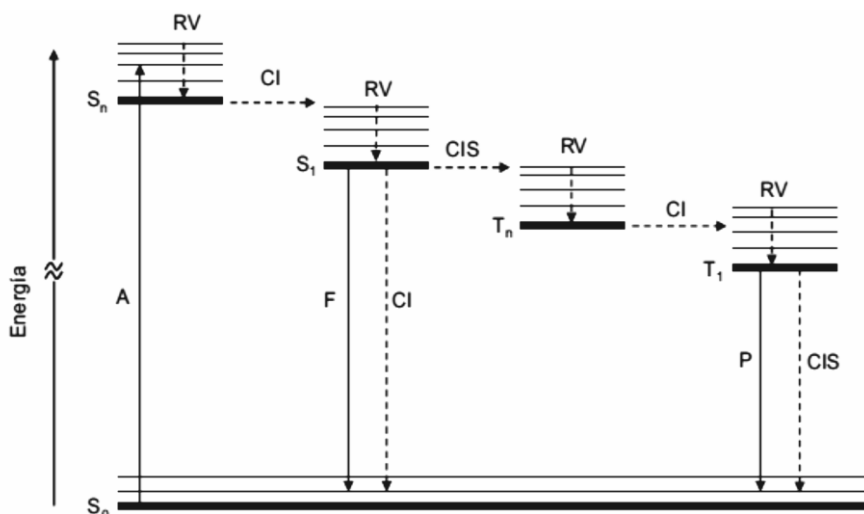


Figura 1.1. Diagrama de Jablonsky modificado, donde se encuentran representados los diferentes niveles de energía (S = singlete y T = triplete) y los procesos posteriores a la absorción de luz (A): Fluorescencia (F), Fosforescencia (P), Conversión interna (CI), Cruce intersistemas (CIS), Relajación vibracional (RV). Las flechas continuas representan procesos fotofísicos radiantes y las discontinuas procesos no radiantes.

Adicionalmente, la luz puede inducir otros procesos entre los que podemos citar la transferencia electrónica, la formación de excíplejos, la transferencia de energía, la transferencia de protón o la formación de excímeros.

1.1.1.- Transferencia electrónica y formación de excíplejo

Un proceso de transferencia electrónica (TEI) tiene lugar cuando una molécula en su estado excitado cede o acepta un electrón a/de otra molécula en su estado fundamental.

Aunque este proceso no implica necesariamente ni la ruptura ni la formación de nuevos enlaces, la reactividad de las especies iónicas resultantes puede ser muy diferente a la de las moléculas neutras. Cuando los dos cromóforos implicados forman parte de una misma molécula se trata de una TEI intramolecular.

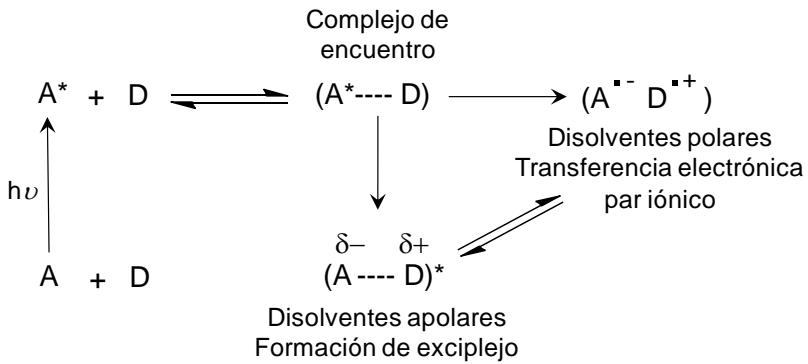
En algunos casos se puede producir un cierto grado de transferencia de carga entre un cromóforo excitado (D^*) y otro cromóforo distinto (A) en estado fundamental o viceversa, si el cromóforo excitado actúa como aceptor (A^*) y el cromóforo en el estado fundamental como dador (D). A la especie resultante se le denomina exciplexo (EX), que se caracteriza por tener un momento dipolar elevado y carácter de carga parcial en cada cromóforo.

Haciendo uso de la ecuación de Rehm-Weller se puede estimar la termodinámica de estos dos procesos:^{1,2}

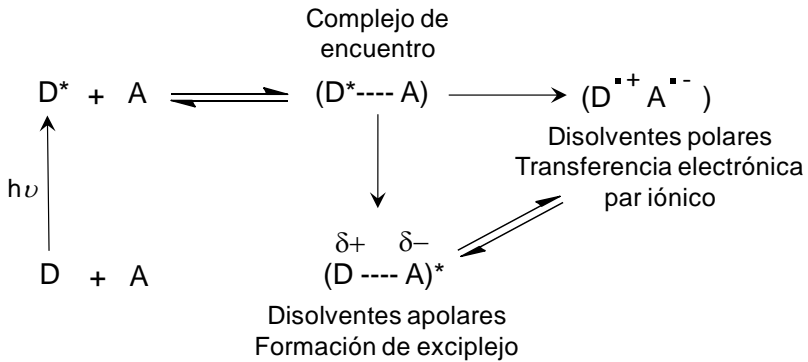
$$\Delta G_{EX} = E_{ox} - E_{red} - \frac{E_{0-0}}{23} - \frac{\mu^2}{\rho^3} \left(\frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - 0.19 \right) + 0.38 \text{ eV} \quad (\text{Ecuación 1.1})$$

$$\Delta G_{TEI} = E_{ox} - E_{red} - \frac{E_{0-0}}{23} + \frac{2.6}{\epsilon} - 0.13 \text{ eV} \quad (\text{Ecuación 1.2})$$

donde E_{ox} y E_{red} son los potenciales de oxidación y reducción en el estado fundamental de dador y aceptor y E_{0-0} es la energía del estado excitado implicado. Así, los disolventes apolares favorecen la formación de EX mientras que los disolventes polares estabilizan el par iónico radicalario generado por TEI, como se puede observar en el Esquema 1.1.^{1,2}



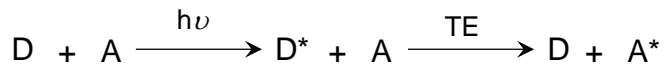
O bien:



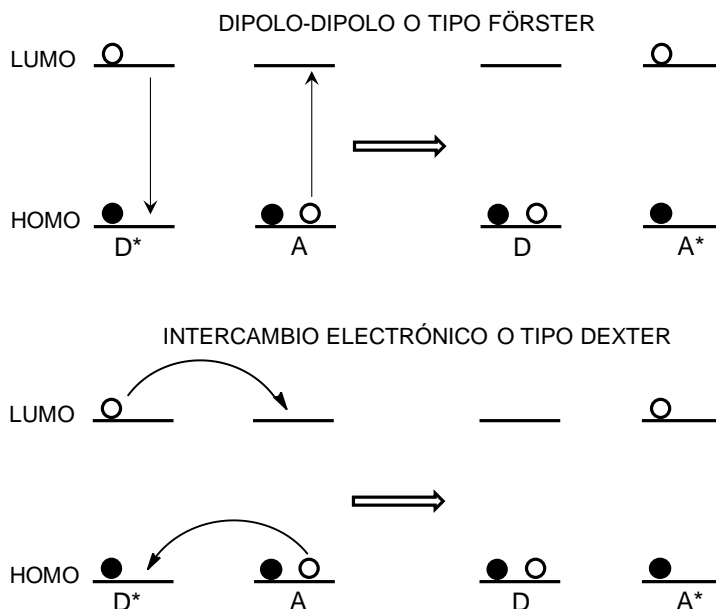
Esquema 1.1. Procesos de TEI y formación de EX entre un aceptor (A) y un dador (D).

1.1.2.- Transferencia de energía

La transferencia de energía fotoinducida (TE) es el proceso por el que un estado excitado de un cromóforo dador (D^*) se desactiva a su estado fundamental (D) mediante la transferencia de su energía a otro cromóforo aceptor (A) el cual pasa a un estado de mayor energía (A^*). Este proceso es posible cuando el espectro de emisión del dador se solapa parcialmente con el de absorción del aceptor.



La TE se puede dar a través de diferentes mecanismos de interacción que pueden ser de tipo coulombico o debido al solapamiento orbital.³ Las interacciones de tipo coulombico consisten en interacciones de largo alcance del tipo dipolo-dipolo (mecanismo tipo Förster) y pueden llegar a darse a distancias de hasta 100 Å, mientras que las interacciones debidas a solapamiento orbital (mecanismo tipo Dexter), ocurren por intercambio electrónico y requieren una gran proximidad entre dador y aceptor (< 5 - 10 Å) ya que debe producirse un solapamiento efectivo entre los orbitales LUMO y HOMO de dador y aceptor. En el Esquema 1.2 se muestra el mecanismo de ambos procesos.

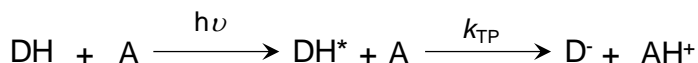


Esquema 1.2. Mecanismos de TE.

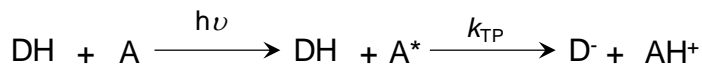
Para que pueda tener lugar un proceso de TE, independientemente del mecanismo por el cual se produzca, la energía del estado excitado del dador ha de ser superior a la del aceptor y su tiempo de vida debe ser suficientemente largo.

1.1.3.- Transferencia de protón

Los procesos de transferencia protónica (TP) fotoinducida se pueden formular como se muestra en el Esquema 1.3 donde el cromóforo dador (DH) transfiere un protón al cromóforo aceptor (A), lo que produciría un cambio en la estructura química del sustrato. Este proceso puede ocurrir indistintamente mediante excitación de DH o A.



O bien:

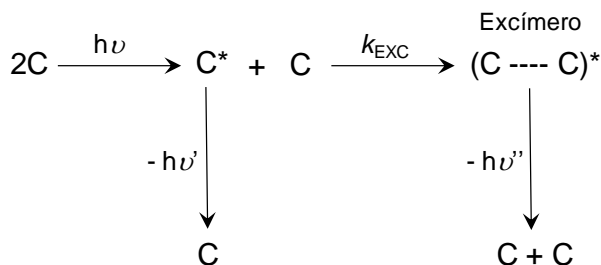


Esquema 1.3. Proceso de transferencia de protón, bien por excitación del dador o del aceptor.

1.1.4.- Formación de excímero

Un excímero (EXC) es una especie que se forma por colisión entre una molécula excitada y otra molécula idéntica en su estado fundamental (ver Esquema 1.4). La representación simbólica (C---C)* intenta describir que la energía de excitación está deslocalizada sobre los dos monómeros.

La formación de un EXC tiene como consecuencia la desactivación de la fluorescencia del monómero generando un dímero en el estado excitado que puede emitir luz. La banda correspondiente a un excímero se localiza a λ mayores que la correspondiente al monómero.⁴⁻⁸



Esquema 1.4. Proceso de formación de excímero para un cromóforo C.

Los EXC se forman de manera habitual en la mayoría de las moléculas aromáticas planas, como por ejemplo hidrocarburos aromáticos policíclicos, tales como el pireno y el antraceno. De la misma forma que los EX, pueden ser detectados haciendo uso de la técnica de fluorescencia.

Contrariamente a lo que ocurre con los EX, en los EXC no suele producirse separación de carga y su estabilización se debe a interacciones tipo π,π .

1.2. Ambientes microheterogéneos

Un ambiente microheterogéneo se puede definir como aquel que es heterogéneo a nivel microscópico pero homogéneo a nivel macroscópico.

Fenómenos tales como el transporte de nutrientes, de medicamentos, etc. en las membranas celulares ocurren a través de interfases. Debido a la complejidad de éstas, se ha promovido la búsqueda de sistemas más sencillos que mimeticen a los medios biológicos. En este contexto, las micelas, ciclodextrinas, proteínas, liposomas, etc., (ver Figura 1.2) constituyen una alternativa adecuada ya que permiten modelizar el comportamiento de un compuesto situado cerca de una interfase o confinado en espacios restringidos.

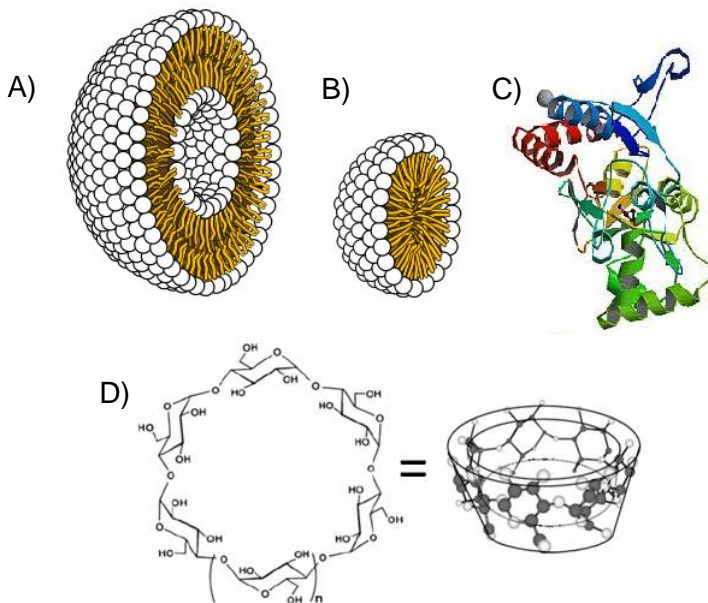


Figura 1.2. A) Liposoma, B) Micela, C) Proteína, D) Ciclodextrina.

Los fenómenos que ocurren en una molécula tras absorber un fotón son muy sensibles a cambios en el entorno que la rodea. En las últimas décadas se ha investigado la influencia de los ambientes microheterogéneos en la fotofísica de muchas moléculas de importancia biológica.⁹⁻¹³ Los procesos fotofísicos y fotoquímicos en un medio

confinado pueden diferir de aquellos que tienen lugar en disolución. Esto se debe a que las especies activas están confinadas en entornos muy reducidos donde las propiedades tales como el pH, la viscosidad y la polaridad entre otras, pueden conducir a cambios notables en los caminos preferidos de desactivación o reacción.

Los ambientes microheterogéneos que van a ser objeto de esta tesis son las proteínas y las micelas mixtas (MM) por lo que es pertinente introducir brevemente sus estructuras y sus interacciones con sustratos.

1.2.1.- Las proteínas

Las proteínas son macromoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos. Son las biomoléculas más diversas y más versátiles. Además de desempeñar una función principal estructural o plástica de ayudar a construir y regenerar tejidos, pueden actuar como enzimas, hormonas, anticuerpos, receptores o como vehículo de transporte de diversas sustancias, tanto endógenas como exógenas.¹⁴

Desde el punto de vista químico, las proteínas son polímeros de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos dispuestos de forma lineal. Constan de cuatro niveles estructurales: estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

La estructura primaria viene determinada por la secuencia de aminoácidos en un orden determinado y característico que forman parte de la cadena peptídica. La estructura secundaria corresponde al

plegamiento de estas cadenas peptídicas, debido a la formación de puentes de hidrógeno, dando lugar a una disposición espacial estable.

La estructura terciaria se genera cuando la estructura secundaria de un polipéptido, al plegarse sobre sí misma, da lugar a una estructura globular tridimensional. Las interacciones que tienen lugar son de tipo puentes disulfuro, enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas e interacciones hidrófobas. La destrucción de la misma supone la pérdida de su función biológica (desnaturalización).

La estructura cuaternaria viene dada por la disposición espacial de varias cadenas polipeptídicas con estructura terciaria que se unen mediante enlaces débiles para dar lugar a una multimérica.

Tanto la interacción entre los aminoácidos de la cadena polipeptídica como la disposición espacial que adoptan dan lugar a la formación del sitio de unión. Por otra parte, en esta cavidad es donde se desarrollan las funciones propias de la proteína como la interacción con sustratos de distinta naturaleza.¹⁵ El sitio de unión está constituido por las cadenas laterales de los residuos de aminoácido específicos que lo forman, lo que le confiere una disposición tridimensional particular distinta al resto de la proteína.¹⁶

Desde un punto de vista general, las interacciones predominantes que se producen entre un ligando y los aminoácidos del sitio de unión de la proteína son de naturaleza iónica, por enlace de hidrógeno o de tipo Van der Waals. En la Figura 1.3 se muestra de forma esquemática la interacción entre un sustrato y el sitio de unión de la proteína.

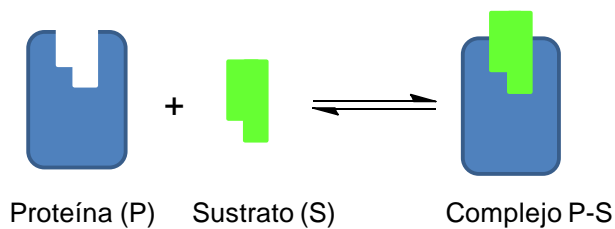


Figura 1.3. Esquema de formación de un complejo proteína-sustrato (P-S).

Las proteínas pueden interaccionar con una gran variedad de sustratos, como iones metálicos, vitaminas, ácidos grasos, fármacos, etc. Las proteínas que son susceptibles de interaccionar con fármacos forman parte de las denominadas dianas farmacológicas. Entre ellas se encuentran los receptores, algunas enzimas y las proteínas transportadoras.¹⁷

- Los receptores farmacológicos son moléculas, generalmente de origen proteico, ubicadas tanto en la membrana celular como intracelularmente. En el centro activo de estos receptores es donde interacciona el fármaco desarrollando su acción. Estas interacciones son principalmente de carácter lábil y reversible. Entre ellos se pueden citar a la fosfolipasa A2 o la ciclooxigenasa.
- Las enzimas son biocatalizadores de naturaleza proteica.^{18,19} Su actividad catalítica engloba a todas las reacciones químicas del metabolismo celular, incrementando la velocidad de los procesos químicos y actuando sobre un determinado sustrato con elevada especificidad y eficiencia. Ejemplos de ellos son el citocromo P450 o las lipasas.

- Las proteínas transportadoras son aquellas que proporcionan un medio de transporte a sustratos que interaccionan con su centro de unión, ya sea en el plasma o a través de la membrana celular. Como ejemplos de proteínas transportadoras se pueden citar las lipoproteínas,²⁰ que transportan los lípidos por todo el organismo; las albúminas séricas,²¹ que son las principales proteínas de transporte y que actúan como vehículo de diversos agentes, tanto endógenos (ácidos grasos, hormonas, enzimas) como exógenos (fármacos) y por último, la α -glicoproteína ácida²² que es la encargada del transporte de fármacos básicos o neutros por el organismo. En la Figura 1.4 se muestran algunos ejemplos de las proteínas descritas.

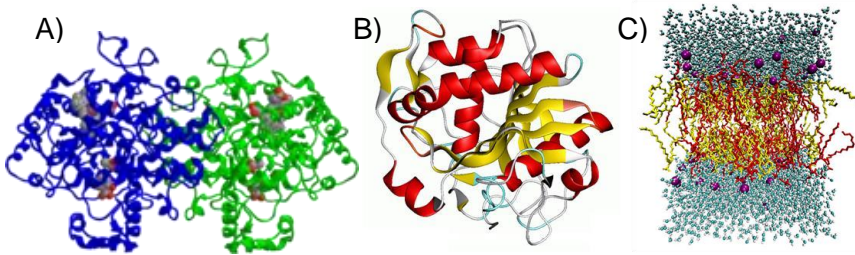


Figura 1.4. A) Ciclooxygenasa-2 (receptor farmacológico), B) Lipasa de *Candida antártica* (enzima), C) Lipoproteína (proteína transportadora).

1.2.2.- Albúmina sérica

La albúmina sérica (AS) se encuentra presente en todas las especies animales. Se puede extraer de bovinos (ASB), ratas, cerdos, humanos (ASH), ovejas etc. aunque las que mayor interés han suscitado son la ASH y la ASB debido a su fácil adquisición y bajo coste.²¹

La ASH es probablemente una de las proteínas más importantes del cuerpo humano, siendo muchas sus aplicaciones tanto en medicina clínica como en investigación básica. Se sintetiza en el hígado y está prácticamente presente en todos los tejidos, sobre todo en la piel y los músculos, aunque también puede encontrarse en cualquier fluido corporal, como por ejemplo en el fluido vítreo y acuoso ocular, en el sudor, las lágrimas, la saliva y la sangre, donde es la proteína transportadora más abundante (3.5-4 g en 100 ml).

Basándose en la alta similitud encontrada en las secuencias de aminoácidos de AS de diversas especies, muchas albúminas se han usado en lugar de ASH para estudios de interacción con fármacos y de farmacocinética, como por ejemplo la ASB que estructuralmente es muy similar.^{23,24}

1.2.2.1.- Función de la albúmina sérica

La función principal de la AS es actuar como vehículo de transporte y distribución de sustancias (tanto endógenas como exógenas) dentro del torrente sanguíneo. Ejemplo de ello es el transporte de fármacos (influyendo así, en la farmacocinética y biodistribución), de ácidos grasos aniónicos de cadena larga, ácidos biliares, hormonas, vitaminas, etc.²⁵ Adicionalmente, la AS también juega un papel primordial a la hora de mantener el pH y la presión osmótica estables en la sangre.²⁶

La interacción de ligandos con AS puede producir un incremento de la solubilidad de éstos en la sangre (como es el caso de los ácidos grasos), así como una disminución de su toxicidad o una protección

frente a la oxidación (como es el caso del daño peroxidativo al ácido linoléico).²⁷ En ocasiones también actúa como reservorio de ciertas toxinas, como en el caso del transporte de la bilirrubina hasta el hígado para su excreción biliar. Además es capaz de interactuar con toxinas exógenas, haciendo que sean menos nocivas para el organismo (como en el caso de la cancerígena aflatoxina G1, que es transportada hasta el hígado para su destrucción).²⁸

Algunas veces la AS presenta actividad enzimática cuando interacciona con moléculas pequeñas. Posee actividad enolasa, y también es capaz de actuar como tioesterasa (ya que posee un grupo sulfhidrilo libre por el residuo de aminoácido cisteína-34), pudiendo llevar a cabo un importante proceso clínico como es la degradación del disulfiram.^{28,29} Asimismo, debido probablemente a la proximidad de la arginina-410 y la tirosina-411 presenta actividad esterasa pudiendo producir la hidrólisis de grasas. Esto es útil desde un punto de vista clínico-farmacéutico, ya que es importante en el proceso de activación de pro-fármacos, como es el caso del medoxomil olmesartan, que se transforma al fármaco activo olmesartan.³⁰ También es de destacar su actividad glucuronidasa, mediante la cual se produce la hidrólisis del glucurónido de algunos fármacos, como carprofeno, naproxeno, flurbiprofeno o ketoprofeno.^{31,32}

1.2.2.2.- Estructura general de la albúmina sérica

La AS es una proteína con un peso molecular promedio de 66 KDa constituida por una cadena polipeptídica simple sin grupos prostéticos u otros aditivos. Contiene 9 logos dobles formados por 17 puentes disulfuro, que envuelven a los residuos de cisteína adyacentes.

Estos se pueden agrupar en tres dominios homólogos (dominio I, II y III), en los cuales pueden interaccionar sustratos de distinta naturaleza. En la Figura 1.5 se muestran los principales dominios de unión de la ASH así como ejemplos de fármacos que se unen a cada sitio de unión. Cada uno de estos dominios contiene 2 logos y se encuentra separado de los contiguos por otro logo. Por tanto, en cada dominio hay dos subdominios A y B, lo que tiene como consecuencia que en las AS exista un amplio y variado número de sitios de unión donde los sustratos puedan interaccionar.²¹

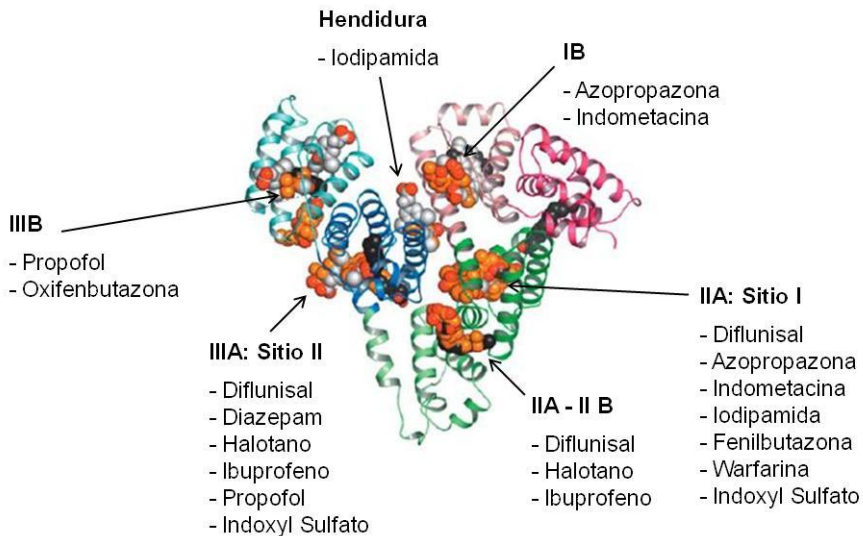


Figura 1.5. Representación de los dominios I, II y III en ASH.

La ASH es una proteína globular que constituye alrededor del 60% del total de proteína en sangre. Consta de 585 aminoácidos entre los cuales existe un tiol libre (Cys-34) y un único triptófano (Trp-214).³³ Los resultados cristalográficos obtenidos a partir de difracción de rayos-X revelan que la cadena polipeptídica se dobla formando una hélice de dimensiones aproximadas de 80 x 80 x 30 Å, y que contiene cerca del

67% de hélice- α , un 10% de giro β y un 23% de cadena extendida.^{26,34,35} Estudios recientes proponen que esta conformación cristalina en estado sólido es muy similar a la que presenta en disolución neutra.³⁶

Por otra parte, la ASB, está constituida por 583 aminoácidos.³⁷ Las albúminas ASH y ASB son muy similares estructuralmente, de hecho la secuencia peptídica de ASB presenta una similitud del 76% con respecto a ASH. En general, las diferencias estructurales que se pueden observar entre ellas derivan de la sustitución de ciertos aminoácidos hidrofóbicos por otros también de carácter hidrofóbico. La ASB posee dos residuos de triptófano en lugar de uno. El primer triptófano, homólogo a ASH, se encuentra en la posición 212, mientras que el segundo se encuentra en la posición 134. Este Trp-134 posee 7 residuos de tirosina (Tyr) próximos, cosa que no ocurre con el residuo de Trp en la posición 212 (en ASH, el Trp-214 tampoco tiene residuos de Tyr próximos). Esta diferencia en la aromaticidad vecinal puede contribuir a que existan diferencias en las propiedades de los dos triptófanos de ASB.²¹ La estructura de la ASH y de la ASB se muestra en la Figura 1.6.

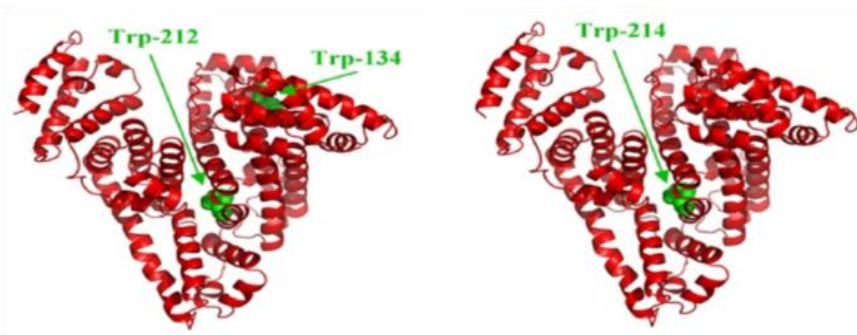


Figura 1.6. Estructura de la ASB (izquierda) y de la ASH (derecha).

1.2.2.3.- Interacción con sustratos

Como ya se ha comentado anteriormente, las AS presentan gran afinidad por ácidos grasos, aminoácidos y algunos metabolitos como la bilirrubina. En la presente tesis doctoral nos centraremos en su interacción con fármacos usados clínicamente y que poseen en su estructura un cromóforo de tipo naftaleno (NP).

El estudio de la interacción fármaco/AS es importante para conocer la farmacocinética (biodistribución, metabolismo, eliminación) y el efecto farmacológico de los fármacos en el organismo. Dicha interacción es generalmente reversible con unas constantes de asociación que oscilan entre 10^4 y 10^6 M^{-1} .²¹ La naturaleza de la misma es de tipo electrostático, por puente de hidrógeno, puente salino o de tipo Van der Waals. En otras ocasiones, esta interacción es irreversible, como ocurre con ciertos metabolitos de fármacos que tienen tendencia a formar glucurónidos²⁷ o con fármacos que posean un grupo tiol capaz de unirse covalentemente al residuo de aminoácido cisteína de la posición 34.³⁸ Este hecho es importante porque se puede alterar el destino metabólico del fármaco en cuestión y pueden cambiar tanto las propiedades estructurales como funcionales de la proteína. Los aductos podrían causar hipersensibilidad y toxicidad hepática y renal aguda.

Aunque las AS poseen varios sitios de unión con sustratos, se sigue aceptando por consenso, para moléculas orgánicas pequeñas, la existencia de dos sitios específicos. Éstos fueron denominados por Sudlow como sitio I (o sitio de unión de la warfarina) y sitio II (o sitio de unión del diazepam).³⁹

El sitio I se encuentra situado en el subdominio IIA³³ en el que las interacciones predominantes son de tipo hidrofóbico.⁴⁰ Como ejemplo de ligandos con gran afinidad por el sitio I se pueden citar la warfarina, la indometacina y la fenilbutazona. El hecho de que moléculas grandes como la bilirrubina interaccionen con él pone en evidencia que el sitio I es flexible y de gran tamaño. Los aminoácidos que tienen mayor relevancia para la interacción con fármacos son Trp-214 y Arg-218.

El sitio II se encuentra ubicado en el subdominio IIIA³³ y las interacciones que predominan en él son de tipo puente de hidrógeno y electrostáticas.⁴⁰ Es de menor tamaño y menos flexible que el sitio I,³³ por tanto, cabe esperar que se observen en mayor grado las interacciones estereoselectivas en este sitio de unión. Un ejemplo clásico es el L-triptófano, cuya afinidad por el sitio II es 100 veces mayor que la del isómero D-triptófano. Los sustratos que suelen unirse al sitio II son ácidos carboxílicos aromáticos. Los aminoácidos Arg-410 y Tyr 411 desempeñan un papel importante en la interacción con ligandos.³³

1.2.3.- α -Glicoproteína ácida

La α -glicoproteína ácida (AAG) es también una proteína plasmática sintetizada en el hígado. Es secretada principalmente por los hepatocitos, aunque puede ser expresada en tejidos extrahepáticos, como células endoteliales o macrófagos alveolares e incluso por otros tejidos en respuesta a procesos inflamatorios. Se distingue de otras glicoproteínas por el hecho de tener un punto isoeléctrico bastante ácido y una elevada solubilidad en agua y en algunos disolventes orgánicos polares.⁴¹

La AAG se encuentra presente en muchas especies de vertebrados. Se puede extraer de humanos (AAGH), bovinos (AAGB), ratas, conejos, etc.

1.2.3.1.- Función de la α -glicoproteína ácida

La AAG se encuentra presente en casi todos los tejidos y fluidos biológicos como el plasma, jugos gástricos, líquido sinovial, etc.⁴² Su vida media es de aproximadamente 5 días y su eliminación renal es baja.⁴³⁻⁴⁶

Aunque su función biológica no está totalmente definida, se conocen muchos procesos donde su participación es importante. Así, en las células endoteliales, la AAG es un componente importante de la barrera capilar, lo cual es esencial para la selectividad de carga capilar.⁴⁷ También puede servir como agente protector en infecciones y contra toxinas, por unión a lectinas tóxicas,⁴⁸ endotoxinas⁴⁹ y lipopolisacáridos bacterianos.⁴⁹ Inhibe la adherencia de la bacteria *Mycoplasma pneumonia* a los macrófagos alveolares,⁵⁰ así como la replicación del rotavirus SA-II actuando directamente sobre el virus.⁵¹

La AAG, además de estimular a las células mononucleares y los macrófagos para secretar el factor- α de necrosis de tumores (TNF- α),⁵² también inhibe la apoptosis inducida por TNF de hepatocitos⁵³ y proporciona protección contra otros efectos tóxicos de TNF.⁵⁴ Posee también actividad inmunosupresiva, demostrada en pacientes con cáncer,⁵⁵ que puede deberse a interacciones electrostáticas entre los grupos de ácidos siálicos de la AAG y fosfolípidos.⁵⁶

Su principal función es como proteína transportadora. Debido a sus propiedades físico-químicas, la AAG se une principalmente a compuestos básicos o neutros de origen tanto endógeno como exógeno, aunque también es capaz de transportar fármacos ácidos.

1.2.3.2.- Estructura general de la α -glicoproteína ácida

La AAGH, cuya estructura se muestra en la Figura 1.7, es una proteína constituida por una sola cadena polipeptídica. Su peso molecular promedio es de 44 KDa. Se trata de una de las proteínas más glicosiladas que existen, ya que gran parte de la misma está formada por azúcares. Atendiendo a diferentes pruebas de desplazamiento se podría decir que AAGH contiene un sólo sitio de unión grande y flexible para la mayoría de fármacos y moléculas pequeñas.

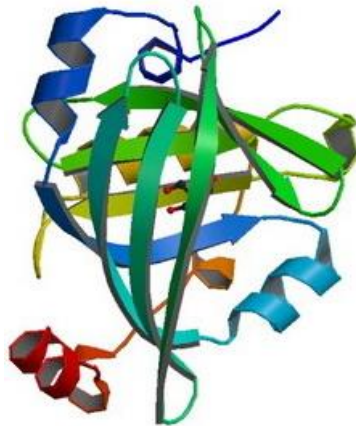


Figura 1.7. Estructura de la AAGH.

La AAGH es una proteína que constituye entre el 1 - 3 % de proteína total en sangre. Está formada por 183 aminoácidos y dos

puentes disulfuro; aproximadamente un 45% de su masa total está formada por carbohidratos.⁵⁷ Debido fundamentalmente al alto contenido de ácido siálico (11 %) en su parte carbohidratada está cargada negativamente, tiene un pKa de 2.6, y un punto isoeléctrico de 2.7.⁴¹ Su estructura es conocida ya que ha sido cristalizada como sal de Pb^{2+} en forma de bipirámide hexagonal.⁵⁸

El papel biológico de la parte oligosacárida se muestra fundamentalmente en procesos de fase aguda,⁵⁹ sin incluir los de unión a AAGH.^{60,61} De los 3 residuos triptófano (en posiciones 25, 122 y 160) sólo los dos últimos están implicados en la unión con fármacos. En el caso de fármacos básicos, el principal aminoácido de la AAGH involucrado es Trp160, mientras que con los ácidos y neutros intervienen His97, Tyr91, Arg105 y Trp 122.

En el caso de la AAGB el número de aminoácidos que la forman es 185.⁶² Se trata de una proteína menos glicosilada que su análoga humana ya que sólo un 26.6 % de su masa total está formada por carbohidratos.⁶³ Asimismo, puesto que el contenido de ácido siálico en su parte carbohidratada (8.3 %) también es menor, su punto isoeléctrico aumenta, variando entre 3.2 - 3.7.⁶³

1.2.3.3.- Interacción con sustratos

A pesar de que se han descrito hasta 7 sitios de unión para AAGH, sólo uno de ellos es de alta afinidad y transporta a la gran mayoría de moléculas que interaccionan con ella.^{59,64,65} El resto de sitios son de baja afinidad y su influencia en la función de transporte de sustratos se considera despreciable.

Las AAG pueden transportar fármacos básicos, neutros y ácidos ya que en su sitio de unión se superponen parcialmente las 3 regiones de unión correspondientes. En la Figura 1.8 se muestra un esquema del sitio de unión de una AAG.

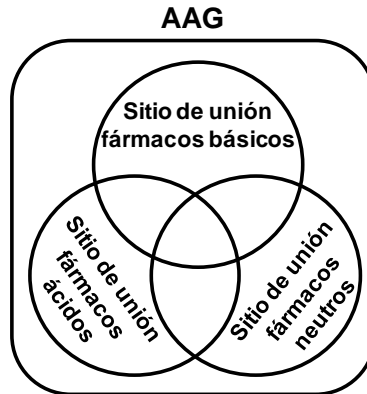


Figura 1.8. Estructura del sitio de unión para fármacos en AAG.

El primer fármaco para el que se describió su unión a AAGH fue el dipiridamol, que es un inhibidor de agregación plaquetaria.⁶⁶ Como ejemplo de fármacos básicos y neutros podemos citar el tamoxifen⁶⁷ y el propranolol (PPN),⁶⁸ respectivamente. La AAGH también puede transportar heparina, un anticoagulante natural, neurotransmisores como la serotonina⁶⁷ o esteroides endógenos como el cortisol.⁶⁹ También es capaz de unirse a moléculas ácidas para su transporte, como fenobarbital⁷⁰ o ácido retinoico.⁷¹

Por otra parte, son escasos los ejemplos conocidos de fármacos que se unen a la AAGB. Algunos de ellos son el antibiótico eritromicina⁷² y el antipsicótico clorpromazina.⁷³ La AAGB también puede interactuar con hormonas esteroideas como la progesterona.⁷³

Aunque generalmente se asume que en el plasma los fármacos se unen principalmente a AS, la AAG puede contribuir significativamente a la concentración total de fármaco unido a proteínas plasmáticas, sobre todo en determinadas condiciones fisiológicas o patológicas donde disminuye la concentración de AS y aumenta la de AAG, como ocurre en los procesos inflamatorios.

1.2.4.- Interacciones competitivas

El tratamiento de enfermedades concurrentes, como la artritis, la diabetes, la hipertensión etc., se basa en la utilización de varios medicamentos simultáneamente. Puesto que la actividad farmacológica depende de la concentración de fármaco libre en el torrente sanguíneo, es importante conocer los mecanismos de las interacciones competitivas entre fármacos, ya que deben tenerse en cuenta a la hora, por ejemplo, de calcular la dosis de un fármaco que se debe suministrar durante la administración simultánea de otro.

Se pueden considerar dos tipos de interacciones competitivas:

- Competición de varios sustratos por un mismo sitio de unión en la proteína.
- Competición de varias proteínas presentes en el medio por la unión a un mismo sustrato.

Debido a la flexibilidad de la albúmina y a que ésta posee un número limitado de sitios de unión de alta afinidad, la unión de un fármaco a AS puede generar cambios en su estructura que pueden influir en la unión de nuevos fármacos.^{74,75} Esta alteración es importante

porque se puede modificar la distribución y eliminación de un fármaco alterándose sus efectos terapéuticos. Este riesgo es mayor cuando dos o más fármacos compiten por el mismo sitio de unión.

En algunos casos esta competición entre dos fármacos por el mismo sitio de unión de la AS o AAG puede generar un aumento en la concentración del fármaco libre en plasma, produciendo un aumento de su actividad. Por ejemplo, la bupivacaína desplaza a la lidocaína⁷⁶ del sitio de unión de AAGH. Si se administran los dos anestésicos locales a la vez podría liberarse lidocaína, aumentando el riesgo de toxicidad. Sin embargo, esta interacción por desplazamiento puede ayudar a potenciar la eficacia de un fármaco, como es el caso del antifolato CB3717, que es potenciado por la coadministración intencionada de dipiridamol⁷⁷ ya que este último desplaza al antifolato del sitio de unión de AAGH, incrementando de esta manera la concentración de fármaco libre.

En otras ocasiones se produce un desplazamiento del fármaco desde el sitio de mayor afinidad a otro de menor afinidad, sin sacarlo fuera de la proteína. Esto ocurre en la unión competitiva de ibuprofeno y carprofeno a la AS, donde el ibuprofeno es desplazado de su sitio II, de mayor afinidad, al sitio I, de menor afinidad.⁷⁸ Este tipo de desplazamientos son importantes para aquellos fármacos que interaccionan fuertemente con la proteína y de los que sólo se requiere una pequeña concentración libre para causar su efecto farmacológico.⁷⁹

En la Figura 1.9 se muestran las 3 formas posibles de interacción de dos fármacos que compiten por el mismo sitio de unión en la ASH.

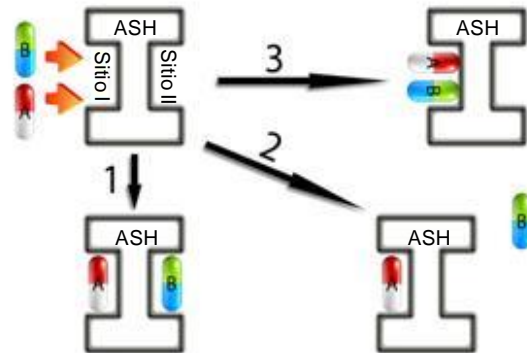


Figura 1.9. Dibujo esquemático de las tres formas posibles de interacción de dos fármacos que compiten por el mismo sitio de unión en la ASH: 1) desplazamiento de un sitio a otro, 2) desplazamiento a la forma libre, 3) ocupación compartida del mismo sitio de unión.

Por otra parte algunos fármacos desplazan sustancias endógenas con afinidad por AAG, lo que aumentaría el nivel plasmático de éstas y podría producir un efecto fisiológico anormal. El caso contrario también es posible. Un nivel anormal de sustancias endógenas en determinadas condiciones podría desplazar a los fármacos de los sitios de unión de la proteína, lo que podría potenciar los efectos del fármaco en cuestión. Por ejemplo, los niveles de bilirrubina se incrementan en la hiperbilirrubinemia producida por hepatitis o cirrosis, lo que puede tener repercusiones clínicas significativas.

Como ya se mencionó anteriormente, en el organismo existen principalmente tres proteínas transportadoras: AS, AAG y lipoproteínas.⁸⁰ Entre ellas, AS es la principal proteína transportadora para fármacos y moléculas pequeñas, pero no la única. Así, AAG también participa en el transporte de fármacos, y en algunos casos, es la principal responsable. El que ambas proteínas sean capaces de

transportar el mismo sustrato, unido al hecho de que en determinadas enfermedades (como en procesos inflamatorios) la concentración de AS disminuya a la vez que aumenta la de AAG, muestran la importancia del estudio de interacción de fármacos con ambas proteínas presentes simultáneamente en el medio.

1.2.5.- Micelas mixtas

La bilis es un fluido biológico complejo cuyos componentes principales son las sales biliares (SB), los fosfolípidos como la lecitina (L), el colesterol (Ch), las proteínas y la bilirrubina.^{81,82} El Ch y la L son co-secretados por los hepatocitos en el hígado en forma de vesículas metaestables termodinámicamente, que luego son parcialmente solubilizadas por SB para dar lugar a micelas mixtas (MM). Puesto que el Ch libre es prácticamente insoluble en agua, la presencia de SB y L en la bilis es fundamental para mantener en disolución al Ch biliar. Éste es sin duda el lípido más conocido por el gran público, debido a la fuerte correlación entre los niveles elevados de Ch en sangre y la incidencia de enfermedades cardiovasculares en humanos, que son las que tienen en la actualidad la tasa de mortalidad más elevada. Otro problema de salud pública muy frecuente es la formación de cálculos en la vesícula biliar. Éstos se forman cuando se produce una supersaturación de Ch en la bilis, como consecuencia de un aumento de su concentración o una disminución de la concentración de SB, lo que hace que el Ch precipite en forma de cristales.

La solubilización del Ch se logra a través de tres tipos de agregados lipídicos cuya estructura puede verse en la Figura 1.10.^{83,84}

1. Micelas simples de SB y Ch: Los monómeros de las SB solubilizan pequeñas cantidades de Ch biliar y, cuando su concentración aumenta, aparecen las micelas simples.
2. Micelas mixtas (MM): formadas por SB (68 %), L (22 %), Ch (9 %) y pequeñas cantidades de bilirrubina. Como se ha comentado anteriormente, son las principales responsables de la solubilización del Ch en el intestino delgado.
3. Vesículas unilaminares o multilaminares: formadas por L y Ch con una pequeña cantidad de SB como surfactante. Cuando se fusionan varias vesículas unilaminares se forman las vesículas multilaminares, también denominadas cristales biliares líquidos.

La solubilidad del Ch en agua puede verse incrementada en más de un millón de veces en presencia de MM.⁸⁵ En el intestino delgado, las micelas y las vesículas coexisten y se interconvierten constante y espontáneamente. Así, en el ayuno, el Ch es solubilizado esencialmente en las vesículas, mientras que en la digestión es transportado principalmente en las MM. Cuando se excede la capacidad de solubilización de éstas aparecen las vesículas ricas en Ch.

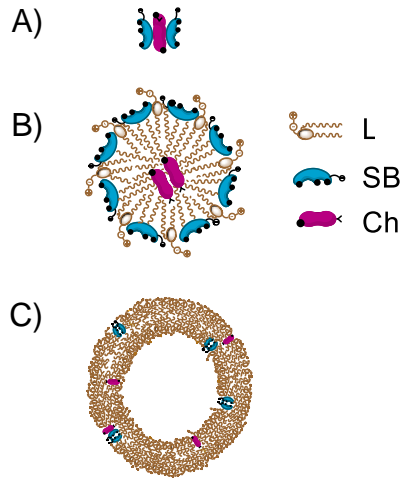


Figura 1.10. Estructura de los tres tipos de agregados lipídicos responsables de la solubilización del Ch. A) Micela simple, B) MM, C) Vesícula unilaminar.

En los últimos años uno de los retos más importantes en la tecnología farmacéutica ha sido desarrollar sistemas transportadores de fármacos y dianas farmacológicas. Con esto se pretende:

- mejorar la estabilidad de los fármacos frente a la degradación enzimática, impidiendo de esta forma que disminuya su efecto farmacológico.
- aumentar la biodisponibilidad y absorción de los fármacos poco solubles en agua, evitando así los efectos secundarios dañinos que pueden producirse al administrar dosis superiores a las realmente necesarias.

En este contexto las MM constituyen una formulación lipídica relativamente simple y bien tolerada, que pueden ser utilizadas como nanotransportadores de fármacos.

1.2.5.1.- Formación de las micelas mixtas

Las MM se forman como consecuencia de la acción disruptora de surfactantes como las SB sobre la estructura de las vesículas unilaminares preformadas de Ch y L.

Esta solubilización se produce siguiendo un modelo que consta de tres etapas.⁸⁶⁻⁸⁸ En una primera etapa, a concentraciones de surfactante menores que su concentración micelar crítica (C.M.C.), las moléculas de SB se distribuyen entre el disolvente acuoso y las vesículas de L / Ch, provocando un aumento del tamaño de éstas. Cuando la concentración de SB en las vesículas alcanza la concentración de saturación (C_{sat}), éstas se fragmentan y se recombinan formando MM. En una segunda etapa coexisten en equilibrio termodinámico las vesículas L / Ch saturadas de SB con las MM compuestas por L / Ch / SB. En una última etapa la concentración de SB continúa aumentando por lo que, al sobrepasar la concentración de solubilización crítica (C_{sc}), se produce la total solubilización y recombinación de las moléculas de L / Ch / SB en forma de MM.

El paso de vesículas lipídicas a MM por la incorporación de surfactantes ha sido estudiada mediante turbidimetría y dispersión de luz cuasi elástica,^{88,89} mientras que la formación de las mismas, puede ser monitorizada mediante la utilización de sondas fluorescentes y la técnica de polarización de la fluorescencia.⁸⁹

1.2.5.2.- Estructura de las micelas mixtas

Las SB son sintetizadas por los hepatocitos a partir del Ch. Entre los ácidos biliares destacan el cólico (AC) y el quenodesoxicólico. La estructura común a todos los ácidos biliares consta de dos partes principales: un núcleo esteroide rígido formado por tres ciclohexanos y un ciclopentano y una cadena alifática corta y flexible con un grupo carboxilo terminal. Desde el punto de vista de su polaridad presentan un carácter anfifílico, ya que tienen una cara hidrofóbica y otra hidrofílica debido a la presencia de grupos hidroxilo.

Por otra parte, la L es un fosfolípido compuesto por una cabeza polar (región hidrofílica) y una cola apolar (región hidrofóbica) que contiene dos cadenas carbonadas de ácidos grasos de longitud variable comprendida, generalmente, entre 14 y 22 átomos de carbono. La región polar presenta un grupo amino y se conecta a la apolar mediante un grupo fosfato unido a una molécula de glicerol. Las colas apolares de ácidos grasos se unen al glicerol mediante un enlace tipo éster.

Otro de los componentes de las MM es el Ch. Este es un lípido esteroide constituido como las SB por cuatro carbociclos condensados, que presenta varias sustituciones como grupos metilo, una cadena alifática y un grupo hidroxilo. Atendiendo a la polaridad, en la molécula de Ch se puede distinguir una región polar (hidrofílica) constituida por el grupo hidroxilo y una cola o región apolar (hidrofóbica) formada por el esqueleto carbonado y los sustituyentes alifáticos. Así, se trata de una molécula muy hidrofóbica y por tanto poco soluble en disolventes polares.

En la Figura 1.11 se muestran las estructuras químicas de los 3 componentes de las MM.

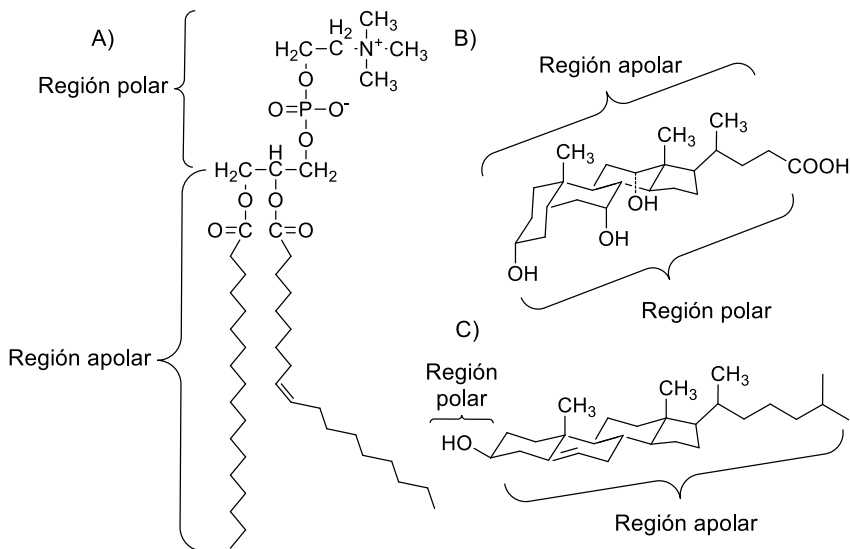


Figura 1.11. Estructura química de los tres componentes de las MM: A) L B) SB C) Ch.

Puesto que tanto SB como L son moléculas anfipáticas, con una parte hidrófila y otra hidrófoba, en disolventes polares tales como el agua dan lugar a MM orientando sus regiones polares hacia la fase acuosa y manteniendo sus regiones apolares alejadas de ésta y creando un centro micelar hidrofóbico donde se transporta el Ch (ver Figura 1.10). Estas entidades moleculares son cuasi-esféricas, termodinámicamente estables y con un diámetro que varía entre 10-70 nm.^{82,90} Entre las técnicas empleadas para el estudio sistemático de su morfología, tamaño y estructura se pueden citar la calorimetría,⁹¹ la dispersión de luz dinámica,^{92,93} la dispersión de rayos X en ángulo pequeño,⁹⁴ la ultracentrifugación,⁹⁵ la microscopía electrónica de transmisión,⁹⁰ la electroforesis⁹⁶ y la RMN.⁹⁷

1.2.5.3.- Interacción con sustratos

La solubilidad es uno de los factores principales en la absorción intestinal de fármacos ya que solamente aquellos que están solubilizados en el sitio de absorción pueden atravesar la membrana intestinal y alcanzar la circulación general.⁹⁸ Éste es un parámetro importante en el caso de fármacos que por sus características estructurales presenten baja solubilidad en agua.

En las últimas décadas, la utilización de transportadores de fármacos basados en formulaciones lipídicas ha suscitado la atención de numerosos investigadores,⁹⁹⁻¹⁰⁴ en particular para fármacos de baja solubilidad intrínseca y alta lipofilia, ya que se evitan las transiciones sólido-disolución y se mejora la solubilización en el lumen intestinal.

El incremento de la solubilización de un fármaco administrado mediante una formulación lipídica se debe a dos aspectos:¹⁰⁵

- La presencia de lípidos en el tracto intestinal puede conducir a un aumento de la secreción biliar de SB, L y Ch, lo que aumenta la concentración local de estas especies que constituyen las MM.
- Los lípidos exógenos que intervienen en la administración del fármaco pueden intercalarse en las MM endógenas, lo que tiene como consecuencia un crecimiento del número de micelas y un aumento de su capacidad de solubilización.

Por todo ello, puesto que las MM están formadas por componentes que las hacen similares a los fluidos fisiológicos

gastrointestinales y no presentan toxicidad, se pueden utilizar como transportadores de fármacos poco solubles como por ejemplo los ansiolíticos diazepam,¹⁰⁶ tetrazepam¹⁰⁷ y clonazepam,¹⁰⁸ el anticancerígeno taxol¹⁰⁹ o el antiinflamatorio no esteroideo indometacina,¹¹⁰ aunque también pueden transportar otro tipo de principios activos como la vitamina K o vitaminas liposolubles.¹¹¹

La localización de los fármacos en el interior de estas entidades moleculares depende de su hidrofobicidad. Ello se debe a que las propiedades físicas, tales como la microviscosidad, polaridad y el grado de hidratación, no son uniformes a lo largo de la MM. Los fármacos hidrófilos serán absorbidos en la superficie de las micelas, los que tengan una solubilidad moderada estarán situados en posiciones intermedias y finalmente los fármacos altamente insolubles se situarán en el núcleo interno de la misma.¹¹² Hay que decir que la solubilización de fármacos en MM no es ilimitada y está afectada por diversos factores, como la hidrofobicidad y la C.M.C. del surfactante o la tensión superficial de la micela. Cuanto mayor sea la hidrofobicidad y menor sea la C.M.C. de la SB, mayor será la capacidad solubilizante de la MM formada.

Por otra parte, además de actuar como transportadoras de fármacos, las MM también les proporcionan un entorno microheterogéneo que los protege de la degradación causada por especies reactivas.¹⁰⁶

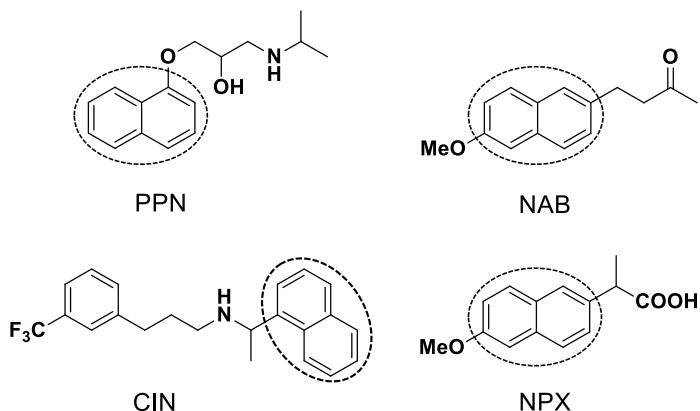
Capítulo 2. Objetivos

2.1. Objetivo general

En medicina, los fármacos son utilizados con fines terapéuticos, diagnósticos o preventivos. Son en general compuestos exógenos, ajenos al organismo vivo, que interaccionan con él. Su transporte hacia la región intracelular ocurre a través de interfases, por lo que modelizar su comportamiento en espacios restringidos utilizando medios microheterogéneos constituye en la actualidad un tema de gran interés.

El objetivo general del presente trabajo consiste en el desarrollo y puesta a punto de una nueva metodología, basada en el uso de técnicas fotofísicas como la fluorescencia y la fotólisis de destello láser (FDL), que proporcione información sobre las interacciones supramoleculares que existen entre fármacos y distintas entidades que actúan como anfitriones. Se estudiarán las especies transitorias generadas tras absorción de luz, utilizándose las propiedades de los estados excitados de los fármacos como parámetros cuantitativos sensibles a las características del medio.

Algunos fármacos que se prescriben en la actualidad para el tratamiento de distintas enfermedades presentan un grupo naftaleno (NP) en su estructura química. De entre ellos, se han seleccionado el (*R*)-cinacalcet (CIN), el (*S*)-propranolol (PPN), el (*S*)-naproxeno (NPX) y la nabumetona (NAB) como sustratos para los diferentes estudios a realizar en esta tesis doctoral; en cuanto a entidades moleculares, se centrará la atención en las proteínas tales como las albúminas séricas humana y bovina (ASH y ASB) o las correspondientes α -glicoproteínas ácidas (AAGH y AAGB), así como en las micelas mixtas (MM).



El PPN es un β -bloqueante no selectivo utilizado para el tratamiento de la hipertensión arterial. Por otra parte, los antiinflamatorios no esteroideos NAB y NPX se emplean para la reducción del dolor y la inflamación. Finalmente, el CIN es un agente calcimimético de nueva generación que se prescribe para el tratamiento del hiperparatiroidismo en pacientes transplantados renales, con insuficiencia renal crónica e insuficiencia renal en diálisis.

Una de las ventajas que presentan la fluorescencia y la FDL es su gran sensibilidad. Son capaces de detectar especies transitorias generadas por el sustrato a concentraciones muy bajas (de hasta 10^{-6} M) tras la absorción de luz. Además, el procedimiento experimental que conlleva el uso de estas técnicas es sencillo y rápido. También hay que destacar que ofrecen resultados altamente reproducibles y de fácil procesado.

Por tanto, las propiedades objeto de estudio mediante esta metodología están relacionadas con los estados excitados (singlete y triplete) de los compuestos seleccionados que contienen un cromóforo

NP, los cuales se usarán como sondas para el estudio de la interacción y distribución de sustratos en proteínas o en MM.

2.2. Objetivos concretos

Los objetivos concretos propuestos en la presente tesis doctoral son los siguientes:

- Caracterizar los estados excitados singlete y triplete de menor energía del fármaco (*R*)-CIN y obtener información relevante acerca de su interacción con la ASH.
- Aplicar la técnica FDL para investigar la distribución de diversos sustratos con cromóforo NP en dos proteínas transportadoras diferentes presentes simultáneamente en el mismo medio. Estos sistemas binarios contienen AS/AAG (humana o bovina) y uno de los fármacos seleccionados, concretamente (*S*)-NPX, (*R*)-CIN o (*S*)-PPN. Con el fin de detectar una posible estereodiferenciación en el proceso de unión se pretende ampliar el estudio a sus correspondientes enantiómeros.
- Explorar el potencial del estado excitado triplete como sonda para revelar interacciones fármaco-fármaco (IFF) dentro del mismo sitio de unión de una proteína transportadora. Para ello, se aplicará la FDL a mezclas de (*S*)-PPN o NAB con (*R*)-CIN dentro de la AAG (humana y bovina). Asimismo, se pretende realizar cálculos teóricos para modelizar la geometría de los complejos y la interacción espacial entre los dos cromóforos de tipo NP dentro de la proteína.

- Evaluar mediante fluorescencia y FDL la encapsulación de los fármacos (*R*)-CIN, (*S*)-PPN, (*S*)-NPX y su correspondiente éster metílico (*S*)-NPXMe en MM como posibles nanotransportadores biomiméticos.

Capítulo 3. Fotofísica del (R)-cinacalcet y su interacción con la albúmina sérica humana (ASH)

3.1. Introducción

El CIN (ver Figura 3.1) es un fármaco calcimimético comercializado recientemente.^{113,114} La acción farmacológica del CIN, que se atribuye principalmente al isómero-(R), es la inhibición de la secreción de la hormona paratiroidea ya que actúa sobre el receptor de calcio (CaR) presente en la superficie de las células paratiroideas.¹¹⁵ Se utiliza para el tratamiento del hiperparatiroidismo en pacientes transplantados renales, con insuficiencia renal crónica e insuficiencia renal en diálisis.¹¹⁶⁻¹¹⁸

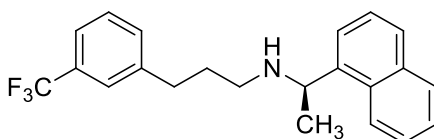


Figura 3.1. Estructura química del CIN.

Además de reducir los niveles de hormona paratiroidea sérica (PTH) y por consiguiente los de calcio en sangre, diversos ensayos clínicos han demostrado que también disminuye el fósforo sérico y la relación calcio / fósforo en pacientes con hiperparatiroidismo secundario.¹¹⁹

Por otra parte, otra de las dolencias tratada con este calcimimético es la hipercalcemia en pacientes con carcinoma de paratiroides, ya que han de producir menos cantidad de PTH con el fin de disminuir el nivel de calcio en sangre.¹²⁰⁻¹²²

En los últimos años se han descrito diversos estudios fotofísicos y fotoquímicos sobre fármacos que contienen, como cromóforo, un

grupo NP como por ejemplo el NPX,^{123,124} el PPN¹²⁵ o la NAB.¹²⁶ Por otra parte, la generación de oxígeno singlete se ha considerado la responsable de las reacciones fototóxicas asociadas a este tipo de fármacos ya que esta especie reactiva es capaz de producir daños a biomoléculas clave como son las proteínas, los lípidos o los ácidos nucleicos.^{127,128} Por tanto, puesto que el CIN también contiene una unidad de NP en su estructura química, en principio, también podría producir este tipo de daños fotobiológicos. Sin embargo, en la literatura aún no hay ningún estudio sobre una posible fototoxicidad de este fármaco.

Tal y como se ha comentado anteriormente, la unión de fármacos a las AS juega un papel importante en su farmacocinética, farmacodinamia, toxicidad, y terapia clínica.^{34,39,129-135} El CIN se une casi cuantitativamente a la ASH¹¹⁵ por lo que es importante una comprensión detallada de las interacciones CIN/ASH.

Con estos antecedentes, el objetivo de este capítulo es estudiar las propiedades fotofísicas y fotoquímicas del CIN. Se pretende caracterizar sus estados excitados singlete y triplete de menor energía, así como obtener información sobre los complejos del CIN con ASH, utilizando técnicas fotofísicas como la fluorescencia y la fotólisis de destello láser (FDL).

3.2. Resultados y discusión

3.2.1.- Propiedades de absorción UV-Vis

El CIN presenta una banda que alcanza más allá de los 300 nm, que muestra la estructura fina típica de los derivados del NP.^{123,124} En la Figura 3.2 se muestra el espectro de absorción UV-Vis del CIN en acetonitrilo.

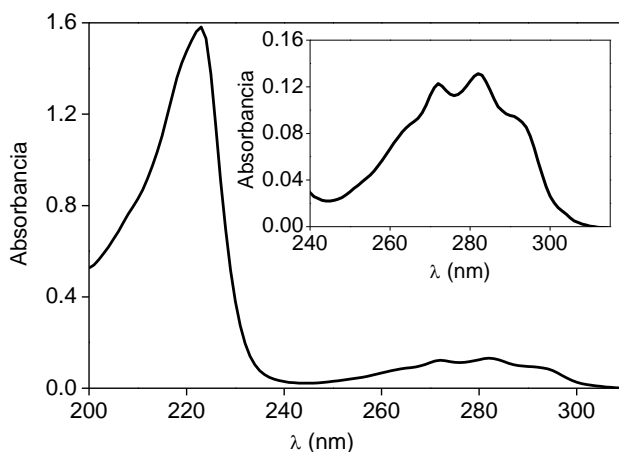


Figura 3.2. Espectro UV-Vis del CIN (2×10^{-5} M) en acetonitrilo. La gráfica interior muestra la ampliación de la zona del espectro de absorción a longitud de onda más larga.

3.2.2.- Medidas de fluorescencia

En el espectro de emisión registrado tras excitar a 290 nm se observan dos bandas con máximos a 332 y 439 nm (ver Figura 3.3 A). La intensidad de dichas bandas es mucho menor en comparación a la banda de emisión del estándar 1-metilnaftaleno, lo que sugiere una eficiente desactivación intramolecular de la emisión del NP por parte del grupo amino.

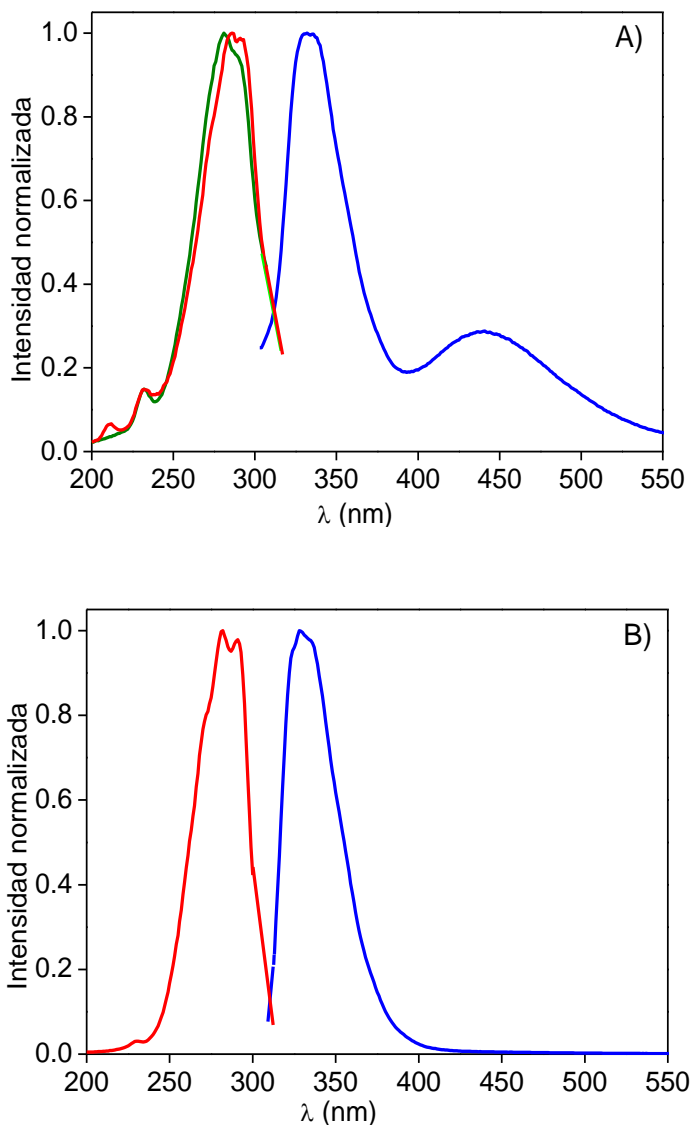


Figura 3.3. A) Espectros normalizados de excitación y emisión del CIN en acetonitrilo (2×10^{-5} M) en atmósfera de N_2 . Azul: emisión, $\lambda_{ex} = 290$ nm, $A_{290} = 0.1$. Verde: excitación, $\lambda_{em} = 320$ nm. Rojo: excitación, $\lambda_{em} = 420$ nm. B) Espectros normalizados de excitación y emisión del CIN en acetonitrilo (2×10^{-5} M) en presencia de ácido acético (2×10^{-2} M) en atmósfera de N_2 . Azul: emisión, $\lambda_{ex} = 290$ nm. Rojo: excitación, $\lambda_{em} = 320$ nm.

La banda situada entre 400 y 500 nm en principio se atribuyó a un EX intramolecular basándonos en el hecho de que los espectros de excitación de las dos bandas son casi idénticos. Además, en presencia de ácido acético (2×10^{-2} M), se pudo observar que puesto que el grupo amino está totalmente protonado, la banda situada entre 400 y 500 nm desaparece (ver Figura 3.3 B) y la intensidad de la banda del monómero es mucho mayor como se muestra en la Figura 3.4.

Cabe destacar que la adición de cantidades crecientes de ácido acético hasta 30 mM a una disolución de CIN en acetonitrilo (5.1×10^{-6} M) produce un aumento espectacular de la banda a 332 nm acompañado de la desaparición progresiva de la emisión del posible EX a 439 nm hasta alcanzar una meseta donde ya todo el grupo amino se encuentra protonado (ver Figura 3.4).

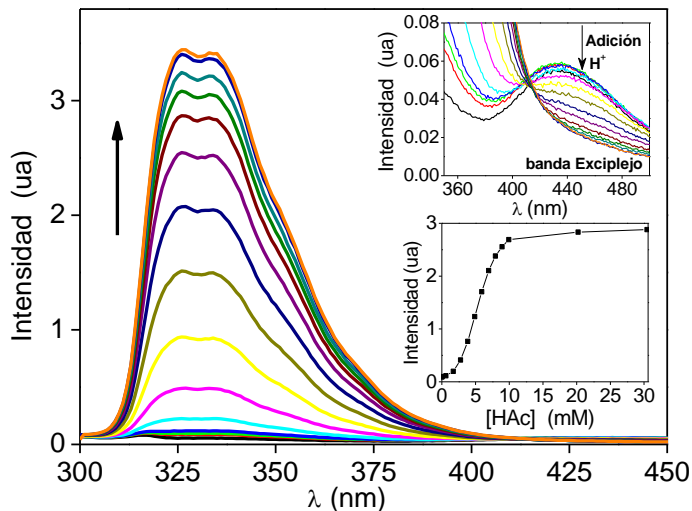


Figura 3.4. Espectros de emisión del CIN en acetonitrilo (5.1×10^{-6} M, $A_{290} = 0.02$, $\lambda_{ex} = 290$ nm) en atmósfera de N_2 en presencia de cantidades crecientes de ácido acético ($0 - 3 \times 10^{-2}$ M). Figura interior superior: Ampliación del espectro de emisión entre 350 y 500 nm. Figura interior inferior: Intensidad de emisión a 332 nm vs. concentración de ácido acético.

Además, no se observaron cambios apreciables en el espectro de absorción tras la adición de ácido acético. Esta observación concuerda con el hecho de que la interacción intramolecular, en el estado excitado singlete, entre el grupo NP y el grupo amino se interrumpe en medio ácido, es decir, cuando el grupo amino se encuentra protonado.

A partir de la intersección de los espectros de emisión y excitación normalizados se determinó la energía del estado excitado singlete (E_{0-0}) tanto para la forma protonada (CINH^+) como para la forma neutra y en ambos casos fue de 91 kcal/mol.

En cuanto a los rendimientos cuánticos de fluorescencia (ϕ_F) se determinaron en diferentes condiciones utilizando 1-metilnaftaleno como patrón ($\phi_F = 0.19$ en acetonitrilo), observándose que mientras para el CINH^+ es comparable al del estándar, en ausencia de ácido el valor obtenido es dos órdenes de magnitud menor. Estos parámetros se recopilan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Propiedades fotofísicas derivadas del primer estado excitado singlete del CIN, tanto en su forma neutra como protonada, en acetonitrilo. Medidas obtenidas excitando a 290 nm.

Parámetro	CIN	CINH ⁺
E_s (kcal/mol)	91	91
ϕ_F (N₂)	< 0.01	0.14
ϕ_F (aire)	< 0.01	0.07
ϕ_F (O₂)	< 0.01	0.02
τ_F (ns)	< 1	40
k_{Fq} (M⁻¹ s⁻¹)	-	1.7×10^{10}

Los experimentos de fluorescencia de tiempo resuelto evidencian una desactivación dinámica intramolecular como es de esperar cuando se forma un EX. Así pues, las cinéticas de desactivación a $\lambda_{em} = 320$ nm registradas en acetonitrilo bajo condiciones anaeróbicas, se ajustan a una función monoexponencial con un tiempo de vida (τ_F) de 40 ns en medio ácido mientras que en ausencia de éste el τ_F fue marcadamente más corto, no pudiéndose medir con exactitud (ver Tabla 3.1).

La naturaleza de la desactivación de la fluorescencia del monómero por el grupo amino puede explicarse bien por TEI^{124,136} o por la formación de un EX.¹²⁴ La variación de la energía libre asociada a estos dos procesos se puede calcular utilizando las ecuaciones de Rehm-Weller (Ecuaciones 1.1 y 1.2)

$$\Delta G_{EX} = E_{ox} - E_{red} - \frac{E_{0-0}}{23} - \frac{\mu^2}{\rho^3} \left(\frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - 0.19 \right) + 0.38 \text{ eV} \text{ (Ecuación 1.1)}$$

$$\Delta G_{TEI} = E_{ox} - E_{red} - \frac{E_{0-0}}{23} + \frac{2.6}{\varepsilon} - 0.13 \text{ eV} \text{ (Ecuación 1.2)}$$

donde E_{ox} y E_{red} es el potencial estándar de oxidación y reducción del dador y el aceptor, respectivamente, E_{0-0} es la energía de excitación del estado electrónico involucrado, ε es la constante dieléctrica del disolvente y μ^2/ρ^3 se estima como 0.75.¹²³

Así, utilizando la dietilamina¹³⁷ (1.01 V) y el 1-metilnaftaleno (-2.58 V) como modelos de los potenciales de oxidación y reducción respectivamente, un valor de $\varepsilon = 37.5$ F/m para el acetonitrilo y

91 kcal/mol como E_{0-0} del CIN, se ha estimado que los valores obtenidos para ΔG_{EX} e ΔG_{TEI} fueron de -4.6 y -9.9 kcal/mol⁻¹, respectivamente. Por tanto, ambos procesos fotoinducidos, formación de EX y TEI del grupo amino al grupo NP, están favorecidos.

Que la formación del EX sea favorable está de acuerdo con la banda observada experimentalmente a 439 nm; sin embargo, la baja intensidad de ésta no justifica que la banda centrada a 320 nm correspondiente al monómero sea tan pequeña en ausencia de ácido. Esto pone de manifiesto que la desactivación de la emisión del monómero no sólo viene dada por la formación del EX sino también por TEI del grupo amino al grupo NP.

Por otra parte, la fluorescencia de $CINH^+$ resultó ser sensible a la presencia de oxígeno como se muestra en la Figura 3.5. Se trata de una desactivación dinámica ya que se observó una disminución τ_F del fármaco al burbujear las muestras con O_2 . La constante de desactivación por O_2 (k_{Fq}) se calculó haciendo uso de la ecuación de Stern-Volmer (ver gráfica interior de la Figura 3.5) dando un valor cercano a la velocidad de difusión como se muestra en la Tabla 3.1.

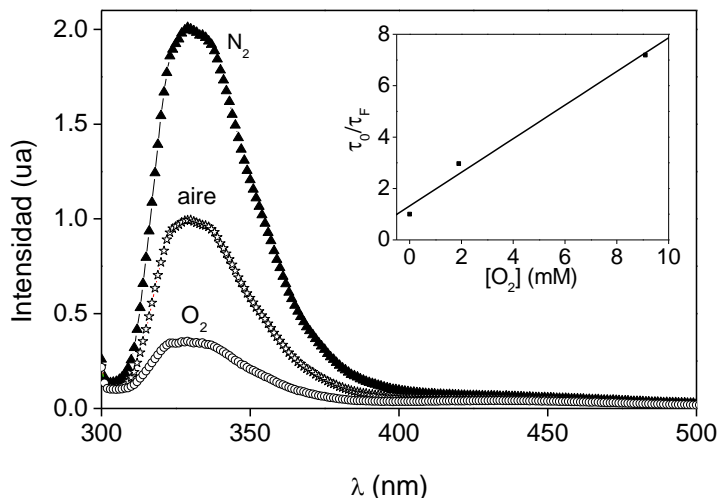


Figura 3.5. Desactivación de la fluorescencia en el estado estacionario de CINH^+ por oxígeno. Espectro de emisión ($\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$) registrado en acetonitrilo ($2 \times 10^{-5} \text{ M}$) / ácido acético ($2 \times 10^{-2} \text{ M}$) en N_2 , aire y O_2 . La gráfica interior es la representación Stern-Volmer para calcular el valor de la constante de desactivación a partir de los tiempos de vida determinados.

3.2.3.- Estudio por fotólisis de destello láser

Se realizaron los estudios de FDL para el CIN y el CINH^+ en disoluciones de acetonitrilo purgadas con nitrógeno. Tras la excitación con el láser pulsado a $\lambda_{\text{ex}} = 308 \text{ nm}$ se registró el espectro de absorción transitoria del CIN y del CINH^+ asignándose en ambos casos el máximo a 420 nm a la transición triplete-triplete ya que se desactivan eficientemente en presencia de oxígeno. En la Figura 3.6 se muestra los espectros de absorción transitoria de ambas especies así como sus cinéticas de desaparición a 420 nm .

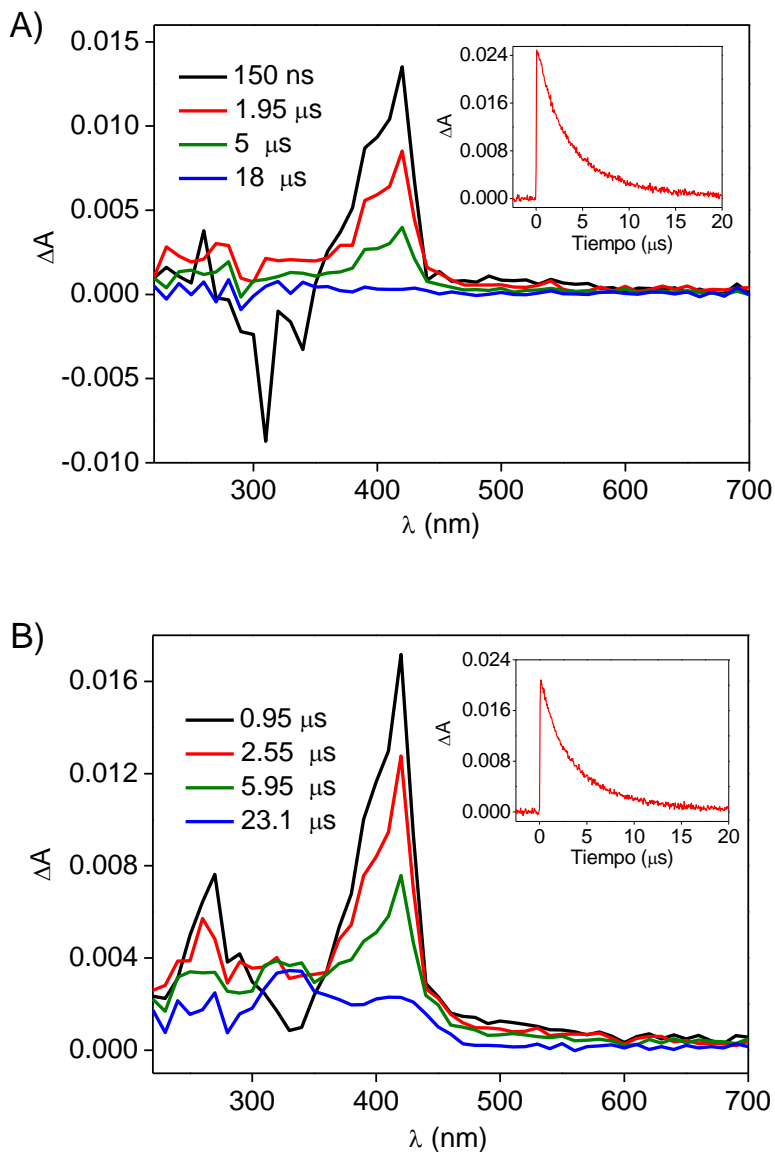


Figura 3.6. Espectros de FDL de A) CIN y B) CIN⁺ registrados a diferentes tiempos después del pulso del láser con disoluciones de acetonitrilo burbujeadas con N₂. La absorbancia de las muestras se fijó a 0.3 a 308 nm. Las gráficas interiores muestran las cinéticas de desaparición de la señal monitorizadas a 420 nm.

El ajuste de las cinéticas de desaparición de la señal a 420 nm mediante una ecuación monoexponencial nos permitió determinar los tiempos de vida de triplete (τ_T) de 4 μ s y 7 μ s, para el CIN y CINH⁺, respectivamente. Los rendimientos cuánticos de triplete (ϕ_T) se determinaron utilizando 1-metilnaftaleno como patrón ($\phi_T = 0.58$ en ciclohexano).¹³⁸ Los valores obtenidos se recogen en la Tabla 3.2.

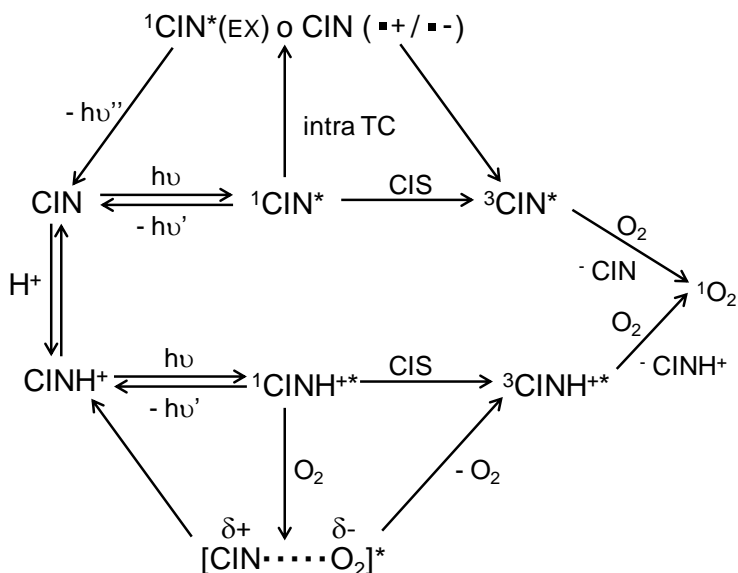
Tabla 3.2. Propiedades fotofísicas derivadas del estado excitado triplete del (³CIN^{*}), tanto en su forma neutra como protonada en acetonitrilo. Medidas obtenidas excitando a 308 nm.

Parámetro	CIN	CINH ⁺
ϕ_T (N ₂)	0.60	0.53
ϕ_T (aire)	0.53	0.49
ϕ_T (O ₂)	0.34	0.43
τ_T (μ s)	4.0	7.0
k_{Tq} (M ⁻¹ s ⁻¹)	1.6 x 10 ⁹	9.8 x 10 ⁸
ϕ_Δ (aire)	0.35	0.35

Es de destacar que para el CIN, la formación del estado excitado triplete fue inusualmente eficiente considerando la desactivación intramolecular que sufrió el singlete precursor. Esto pone de manifiesto que existen caminos alternativos para poblar el (³CIN^{*}) como son la TEI a partir del par de iones radicales o el CIS a partir del EX.

Por otro lado, para el CINH⁺ se observó un ϕ_T elevado (en todas las condiciones experimentales) en comparación con el ϕ_F del singlete precursor (ver Tabla 3.1 y 3.2) lo que indica que la desactivación de la

fluorescencia por O_2 también contribuye a la generación de estado excitado triplete a través de la formación de un complejo de transferencia de carga.^{139,140} En el Esquema 3.1 se resumen las vías mecánicas de los estados excitados tanto del CIN como del $CINH^+$.



Esquema 3.1. Rutas mecánicas de los estados excitados del CIN y del $CINH^+$.

Es conocido en la literatura que la desactivación del estado excitado singlete por O_2 puede dar lugar a estado excitado triplete mediante CIS^{140,141} y que, siempre que la diferencia de energía entre el estado singlete y triplete sea mayor que 23 kcal/mol, se puede producir 1O_2 . A pesar de que este requisito se cumple en los derivados del NP (31 kcal/mol en el caso de $CINH^+$) se ha demostrado la desactivación del triplete es casi la única fuente de 1O_2 .

Como suele ser habitual, tanto el estado excitado triplete del CIN como el del $CINH^+$ resultaron ser sensibles a la presencia de O_2 ; las cinéticas de desactivación se calcularon haciendo uso de la ecuación de

Stern-Volmer. El rendimiento cuántico de oxígeno singlete (ϕ_{Δ}) se determinó por emisión de fosforescencia en el infrarrojo cercano a 1270 nm y resultó ser 0.35 (ver Tabla 3.2).

Una vez caracterizados los estados excitados singlete y triplete en ausencia de ASH, se procedió al estudio de la interacción de CIN con esta proteína.

3.2.4.- Fotofísica de los complejos fármaco/proteína en medio acuoso neutro

Teniendo en cuenta que el CIN tiene un valor de pK_a de 8.72,¹⁴² todo el compuesto está protonado en disolución tamponada de PBS (pH = 7.4).

En primer lugar se realizó el estudio de fluorescencia del CIN en presencia de proteína. En la Figura 3.7 se puede observar el espectro de emisión, en aire, de $CINH^+$ en PBS y en presencia de una cantidad equimolar de ASH, el cual se obtuvo tras excitar a 290 nm. Paralelamente se registró el espectro de emisión de la proteína sola como experimento control y como era de esperar aparece un máximo a 340 nm que corresponde a su único residuo triptófano¹⁴³ (ver Figura 3.7).

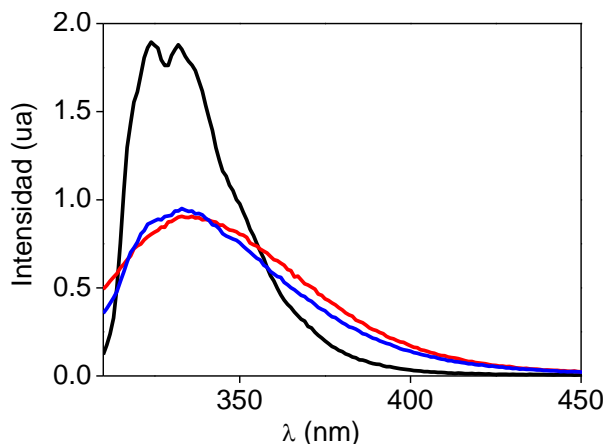


Figura 3.7. Espectro de fluorescencia del CINH^+ en PBS (negro), en presencia de una cantidad equimolar de ASH (azul), y el de la proteína en ausencia de fármaco (rojo). En todos los casos, la absorbancia de las muestras está fijada a 0.1 a 290 nm.

Puesto que la ASH y el CINH^+ absorben y emiten a la misma longitud de onda, el τ_F y el ϕ_F no se pudieron determinar con exactitud. Por tanto, el valor de $\phi_F = 0.06$ que se muestra en la Tabla 3.3 corresponde a la combinación de las emisiones tanto del fármaco como de la proteína, aunque el ϕ_F intrínseco del complejo $\text{CINH}^+@ASH$ debe ser muy similar al valor encontrado en ausencia de proteína (0.08).

En realidad, la emisión del complejo CINH^+/ASH a relación molar 1:1 coincide aproximadamente con la simulación de dicho espectro teniendo en cuenta las contribuciones relativas de la proteína y el fármaco en el espectro de absorción. Esto indica que la fluorescencia real del complejo es la suma de los dos componentes emitiendo de forma independiente y por tanto no hay TE de la proteína al fármaco. Este comportamiento también se ha observado en otros derivados de NP relacionados.¹³⁵

Los experimentos de FDL se realizaron en PBS en condiciones aeróbicas. El CINH^+ en medio acuoso neutro presenta una solubilidad reducida y no se pudieron preparar disoluciones transparentes a 308 nm con una absorbancia adecuada (0.3). Por tanto, las medidas tuvieron que llevarse a cabo a una longitud de onda de excitación de 266 nm. Sin embargo, en presencia de proteína este problema desaparece ya que el fármaco se solubiliza completamente, indicando que se forman complejos fármaco/ASH.

Tras incubar la disolución de fármaco con proteína durante 1 hora en oscuridad se registraron los espectros de absorción transitoria ($\lambda_{\text{ex}} = 308 \text{ nm}$) asignándose el máximo a 420 nm a la transición triplete-triplete por comparación con el espectro registrado anteriormente del fármaco en acetonitrilo. En la Figura 3.8 se muestra el espectro de absorción transitoria del complejo CINH^+/ASH así como su cinética de desaparición a 420 nm.

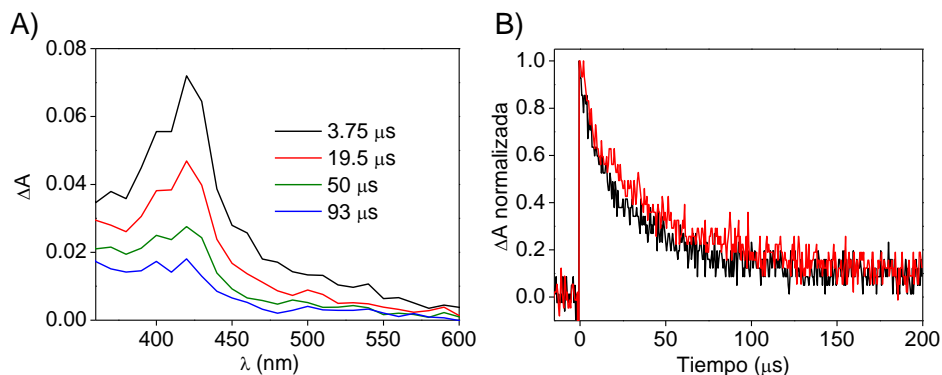
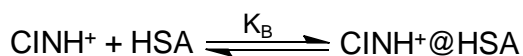


Figura 3.8. A) Espectro de FDL del CIN en presencia de una cantidad equimolar de ASH (1:1) registrado a diferentes tiempos después del pulso del láser en PBS bajo condiciones aeróbicas. La absorbancia de las muestras está fijada a 0.3 a 308 nm. B) Cinéticas de desaparición normalizadas de CINH^+/ASH a relación molar (1:1) monitorizadas a 420 nm tras FDL ($\lambda_{\text{ex}} = 308 \text{ nm}$) en disolución de PBS en ausencia (negro) y en presencia (rojo) de sulfito.

La cinética de desaparición del complejo se ajusta a una ecuación con dos términos monoexponenciales correspondientes a un tiempo de vida corto de 8 μs y uno más largo de 37 μs atribuidos a los dos sitios de unión de la ASH. A partir de los factores preexponenciales se asignaron las contribuciones relativas de cada uno de ellos, siendo 45 % y 55 % respectivamente. Para descartar que el tiempo de vida corto era del fármaco que quedaba libre en disolución se realizaron experimentos con cantidades crecientes de proteína comprobando que la contribución del tiempo de vida corto permanecía inalterada.

La unión reversible de la ASH al fármaco para dar un complejo 1:1 (CINH⁺@ASH) se puede representar con el siguiente equilibrio:



$$K_B = \frac{[\text{CINH}^+@ \text{HSA}]}{[\text{CINH}^+] [\text{HSA}]}$$

donde K_B es la constante de asociación, $[\text{CINH}^+@ \text{ASH}]$ es la concentración del complejo y $[\text{CINH}^+]$ y $[\text{ASH}]$ son las concentraciones de fármaco y proteína libre en disolución, respectivamente.

Para la determinación de la constante de asociación K_B se llevaron a cabo experimentos de FDL a una longitud de onda de excitación de 266 nm. Se registraron las cinéticas de desactivación de disoluciones de fármaco en PBS (5×10^{-5} M) con cantidades variables de ASH en un rango de concentración $(4 - 6) \times 10^{-5}$ M. Las concentraciones de proteína y CIN requeridas para dicho experimento

se obtuvieron a partir del ajuste de la cinética de desaparición a 420 nm como la contribución relativa de tres términos con diferentes tiempos de vida (CINH⁺ libre, unido al Sitio I y unido al Sitio II). Puesto que las poblaciones relativas de los dos sitios de unión de la proteína son similares se supuso que las afinidades también lo eran por lo que los porcentajes de los dos componentes unidos se combinaron para la determinación de un valor promedio de K_B cuyo valor fue $6.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Por otra parte, a partir de la intensidad de la señal del triplete inmediatamente después del pulso del láser se determinó, para el CINH⁺ dentro de los sitios de unión de la proteína, un rendimiento cuántico de CIS bajo condiciones aeróbicas de 0.56, valor muy similar al calculado en acetonitrilo. En la Tabla 3.3 se recopilan los distintos parámetros fotofísicos del CINH⁺ en PBS así como del complejo fármaco/proteína.

Tabla 3.3. Propiedades fotofísicas derivadas de los estados excitados singlete y triplete del CINH⁺ tanto en PBS como en presencia de una cantidad equimolar de ASH en aire.

Parámetro	CINH ⁺	CINH ⁺ /ASH
ϕ_F	0.08	0.06
τ_F (ns)	30	ND
ϕ_T	0.49 ^a	0.56
τ_T (μs)	1.9 ^a	8 y 37
k_{Tq} (M ⁻¹ s ⁻¹) ^b	1.7×10^9	5.4×10^7
ϕ_Δ (aire)	0.35	ca. 0

ND: no determinado ya que la emisión contiene las contribuciones tanto del fármaco como del triptófano. ^a $\lambda_{ex} = 266 \text{ nm}$. ^b Constante de desactivación por O₂ del estado excitado triplete.

Por otro lado, para evaluar la desactivación del estado excitado triplete por oxígeno en el microambiente proporcionado por la proteína se procedió a la desoxigenación química de disoluciones de CINH⁺/ASH mediante la adición de sulfito sódico (ca. 2×10^{-3} M). Tras la excitación con el láser pulsado a $\lambda_{\text{ex}} = 308$ nm se registraron las cinéticas de desactivación a 420 nm en presencia y en ausencia de sulfito. Como se muestra en la Figura 3.8 B, el τ_T en la proteína bajo condiciones anaeróbicas se alargó. Sin embargo, el valor de la constante de desactivación fue $5.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, que es dos órdenes de magnitud menor que la hallada para el fármaco en disolución (ver Tabla 3.4). Esto puede atribuirse a que las constantes de difusión relativas tienden a ser menores en sistemas microheterogéneos. Como consecuencia de ello, el rendimiento cuántico de oxígeno singlete (ϕ_{Δ}) encontrado dentro de la proteína fue prácticamente insignificante mientras que en disolución acuosa su valor fue de 0.35.

3.3. Conclusiones

El estado excitado singlete del CIN se desactiva intramolecularmente por el grupo amino, generando un exciplexo. En presencia de ácido, este grupo se encuentra protonado y por tanto, no se observa dicha desactivación.

La propiedad fotofísica más importante, desde un punto de vista biológico, es la formación del estado excitado triplete, tanto en medio orgánico como acuoso, con un rendimiento cuántico relativamente alto.

Tras la administración a los pacientes, este fármaco se une casi cuantitativamente a la ASH dando lugar a complejos en los que la vida del estado excitado triplete es más largo que en disolución. Más importante aún es el hecho de que la constante de velocidad de desactivación por oxígeno es dos órdenes de magnitud menor que en disolución, lo que se puede atribuir a que las constantes de difusión son relativamente menores en estos sistemas microheterogéneos. Por tanto, se observa que la proteína proporciona al fármaco un microambiente que lo protege del ataque por oxígeno, lo que impide los efectos fototóxicos causados por la formación de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) aumentando así la fotoseguridad del fármaco.

3.4. Procedimiento experimental

3.4.1.- Materiales y disolventes

El (*R*)-CIN se extrajo del fármaco comercial Mimpara 60 mg (Amgen, España). El contenido de seis pastillas se convirtió en polvo en un mortero, se suspendió en NH_4OH 1M (50 mL) y se extrajo con diclorometano (4 x 50 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (3 x 150 mL) y con agua (3 x 150 mL), se secaron sobre MgSO_4 y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice 60 (fase móvil: diclorometano / metanol / hidróxido amónico (15 M) 98 : 2 : 0.1 v / v / v) obteniéndose (*R*)-CIN en forma de base libre como un aceite incoloro.

La ASH (min. 99% de ácido graso libre) fue suministrada por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). La solución de tampón fosfato (PBS, pH = 7.4, 0.01 M) fue preparada disolviendo tabletas de Sigma en la cantidad apropiada de agua desionizada. Todos los otros disolventes utilizados fueron de calidad HPLC.

3.4.2.- Medidas de fluorescencia

Las medidas de fluorescencia se realizaron a temperatura ambiente con disoluciones de acetonitrilo burbujeadas con nitrógeno o con disoluciones de PBS en condiciones aeróbicas.

Se utilizaron celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico y la absorbancia de las muestras se fijó a 0.1 aproximadamente, para la longitud de onda de excitación ($\lambda_{exc} = 290$ nm).

El 1-metilnaftaleno ($\phi_F = 0.19$ en acetonitrilo)¹³⁸ fue empleado como estándar para la medida del ϕ_F del CIN en presencia de ácido disuelto en acetonitrilo y burbujeadado con nitrógeno utilizando la Ecuación 3.1:

$$\phi_F = \phi_s \frac{n_i^2 I_i (1 - 10^{-A_s(\lambda_{exc})})}{n_s^2 I_s (1 - 10^{-A_i(\lambda_{exc})})} \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

donde A es la absorbancia a la longitud de onda de excitación, I es el área bajo el espectro de fluorescencia corregido y n es el índice de refracción del disolvente. Los sufijos “i” y “s” se refieren al CIN y al estándar respectivamente. Las medidas de emisión se llevaron a cabo en el rango 300-560 nm y en el rango de 200-310 nm se hicieron las de excitación.

Para calcular el τ_F , las cinéticas de desaparición se ajustaron a una ecuación con uno o dos términos monoexponenciales utilizando un método de deconvolución donde se tiene en cuenta el pulso de la lámpara.

3.4.3.- Medidas de fotólisis de destello láser

Las medidas de FDL se realizaron a temperatura ambiente y la absorbancia de las muestras se fijó a ca. 0.3 para la longitud de onda de excitación (308 ó 266 nm).

Todos los espectros de absorción transitorios se registraron utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico con capacidad para 4 mL previamente burbujeados con N₂, aire u O₂. Las cinéticas de desaparición se monitorizaron a 420 nm.

Los experimentos en presencia de diferentes concentraciones de proteína se llevaron a cabo en PBS bajo condiciones aeróbicas. Las disoluciones se incubaron 1 hora en oscuridad antes de la adquisición. Para obtener disoluciones de CINH⁺/ASH en condiciones anaeróbicas se procedió a la desoxigenación química de las mismas mediante la adición de sulfito sódico (ca. 2×10^{-3} M).¹⁴⁴

El τ_T del CIN en acetonitrilo, en presencia o no de ácido, se determinó por ajuste a una ecuación con un término monoexponencial mientras que en presencia de proteína se necesitaron dos términos monoexponenciales.

El 1-metilnaftaleno ($\phi_T = 0.58$ en ciclohexano)¹³⁸ fue empleado como patrón para determinar el ϕ_T del CIN, en presencia o no de ácido, disuelto en acetonitrilo y burbujeado con nitrógeno.

3.4.4.- Medidas de oxígeno singlete

Las medidas de oxígeno singlete se realizaron a temperatura ambiente utilizando acetonitrilo o D₂O (pD = 7.4) en condiciones aeróbicas. Se utilizaron celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico. La absorbancia de las muestras se fijó a ca. 0.3, para la longitud de onda de excitación (266 nm) y las cinéticas de desaparición de la fosforescencia se monitorizaron a 1270 nm.

Para la determinación de ϕ_{Δ} se utilizaron el 1-metilnaftaleno ($\phi_{\Delta}=0.33$ en acetonitrilo)¹⁴⁰ o NPX ($\phi_{\Delta} = 0.25$ en D₂O a pD = 7.4)¹²⁷ como patrones. Así, la formación de oxígeno singlete se calculó a partir de la pendiente de la gráfica que se obtuvo al representar la intensidad de la señal a tiempo cero frente a la potencia del láser de acuerdo con la Ecuación 3.2 utilizando para ello distintos filtros que variaban la intensidad del láser.

$$\phi_{\Delta(\text{Muestra})} = \frac{I_{\text{Muestra}}}{I_{\text{Estándar}}} \phi_{\Delta(\text{Estándar})} \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

donde I_{Muestra} e $I_{\text{Estándar}}$ son la intensidad de emisión de la muestra y del estándar respectivamente y $\phi_{\Delta(\text{Estándar})}$ es el rendimiento cuántico de oxígeno singlete del patrón.

En general, todos los experimentos se repitieron por triplicado utilizando muestra fresca cada vez y los valores obtenidos tienen un margen de error del $\pm 5\%$.

Capítulo 4. Determinación de la distribución de fármaco en sistemas binarios albúmina sérica/ α -glicoproteína ácida (AS/AAG)

4.1. Introducción

Como ya se mencionó en los antecedentes bibliográficos, la AS y la AAG son las proteínas transportadoras más abundantes en el torrente circulatorio.^{21,22} En condiciones normales, las AS se encuentran en mayor porcentaje en el plasma, mientras que en determinadas enfermedades como los procesos inflamatorios, su concentración disminuye a la vez que aumenta la de AAG. Esta es la razón por la que la interacción de fármacos con estas dos proteínas transportadoras presentes simultáneamente en el mismo medio se convierte en una cuestión importante.

La investigación de la unión de un ligando a una sola proteína se realiza generalmente mediante ultrafiltración, cromatografía líquida, dicroísmo circular, electroforesis capilar, espectroscopía de RMN, fluorescencia y ensayos bioquímicos. Desafortunadamente, ninguna de estas técnicas es apropiada para la cuantificación rápida y consistente de la distribución del fármaco entre dos proteínas diferentes de origen natural en el mismo medio biológico. Así, el estudio a tiempo real de la competencia entre las interacciones entre fármacos y proteínas AS/AAG presentes a la vez en el mismo medio es difícil de abordar con las herramientas analíticas existentes. Por tanto, sería muy útil el desarrollo de metodologías adecuadas, especialmente en el contexto de un problema más general, donde sistemas biológicos microheterogéneos compuestos por diferentes compartimentos son accesibles para moléculas de bajo peso molecular como los ligandos.^{23,24,131,145,146}

Recientemente se ha descrito la utilización de los estados excitados triplete para evaluar la unión de fármacos a proteínas transportadoras, basándose en el hecho de que las propiedades de estas especies transitorias (en particular, el tiempo de vida) son muy sensibles al microambiente. Esta metodología, basada en el uso de la fotólisis de destello láser (FDL), se ha aplicado con éxito al estudio de la unión del flurbiprofeno (FBP) o su éster metílico (FBPMe) a proteína,¹⁴⁷ a la determinación de la composición enantiomérica en mezclas (S)- y (R)-FBP¹⁴⁷ o al estudio de la actividad glucuronidasa de la ASH con el glucurónido del FBP (FBPgluc).¹⁴⁸ Además, existen trabajos previos que muestran resultados preliminares sobre la unión del FBP y del FBPMe en sistemas binarios AS/AAG¹⁴⁹ que indican que la FDL puede ser de aplicación general para evaluar la distribución de fármacos entre dos proteínas presentes en el mismo medio.

Los fármacos CIN, PPN, NPX (Figura 4.1) a pesar de que comparten un cromóforo común, NP, muestran un comportamiento diferente de unión hacia las AS o AAG. El NPX se une eficientemente a las AS (preferentemente al sitio II), con constantes de asociación (K_B) en el rango de $10^6 - 10^7 \text{ M}^{-1}$.¹⁵⁰⁻¹⁵⁶ En cuanto a PPN, presenta menor afinidad por las AS (con valores de K_B en el orden de 10^3 M^{-1}),¹⁵⁷ aunque se une fuertemente a las AAG ($K_B = (2 - 4) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$).¹⁵⁸ Por último, el CIN, a dosis terapéuticas en la sangre, se encuentra cuantitativamente unido a proteínas transportadoras.¹⁵⁹ Por tanto, estos sistemas son adecuados para comprobar si la espectroscopía de absorción transitoria puede ser una herramienta adecuada para discriminar entre patrones de distribución diferentes en sistemas binarios AS/AAG.

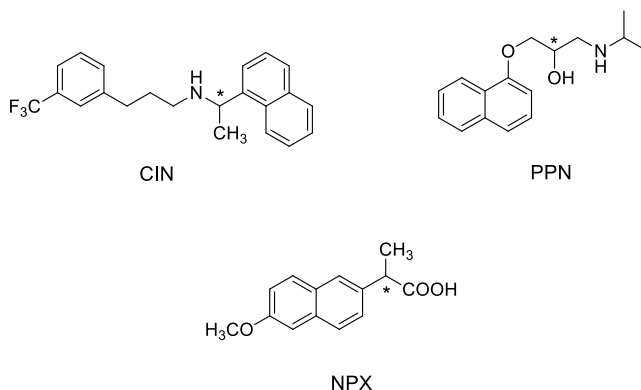


Figura 4.1. Estructura química del CIN, NPX y PPN.

Las propiedades fotofísicas del NPX, PPN y el CIN en disolución ya han sido caracterizadas.^{124,125,159} En todos los casos se detecta el estado excitado triplete como una banda de absorción transitoria centrada entre 420 - 440 nm con un moderado ϕ_T (0.28 - 0.60) y tiempos de vida en el rango de microsegundos.

Además, con el fin de detectar una posible estereodiferenciación en el proceso de unión, se han llevado a cabo estudios paralelos con los enantiómeros (*S*)- y (*R*)- de cada uno de los fármacos.

4.2. Resultados y discusión

La aplicación de la metodología de FDL se basa en una discriminación significativa entre el tiempo de vida del triplete (τ_T) del fármaco dentro de los sitios de unión a proteínas. Antes de investigar los sistemas binarios, fue necesario determinar el tiempo de vida de triplete de dichos fármacos en PBS, AS y AAG por separado.

Posteriormente, ajustando las cinéticas de desaparición del estado excitado triplete en los sistemas binarios AS/AAG y utilizando los valores de τ_T determinados en cada medio, se pudo determinar la distribución de fármaco en las distintas proteínas a partir de los factores preexponenciales.

4.2.1.- Unión de NPX a proteínas

Se llevaron a cabo estudios de FDL para el (S)- y el (R)-NPX en disoluciones de PBS en condiciones aeróbicas. La Figura 4.2 muestra el espectro de absorción transitoria de uno de los enantiómeros tras la excitación con el láser pulsado a 308 nm donde se detectaron dos especies transitorias.

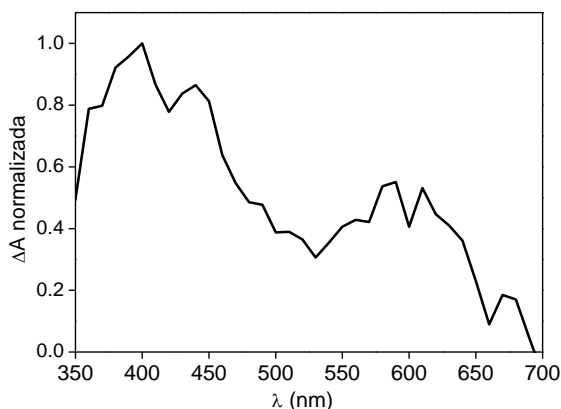


Figura 4.2. Espectro de FDL ($\lambda_{ex} = 308$ nm) de una disolución 2×10^{-4} M de (S)-NPX en PBS 0.01 M (pH = 7.4) registrado $1 \mu s$ después del pulso del láser en aire.

La banda con un máximo a 440 nm se atribuye a la transición triplete-triplete mientras que la otra banda de absorción más débil en el rango de 550 - 650 nm corresponde al catión radical que se forma por fotoionización del NP.¹²⁴ El tiempo de vida de triplete obtenido,

ajustando la cinética de desaparición con dos términos monoexponenciales, fue de 1.8 μs que corresponde al componente mayoritario.

Como se puede apreciar en la Figura 4.3, en presencia de diferentes proteínas (ASH o ASB), sólo se detectó la transición triplete-triplete con un máximo a 440 nm.

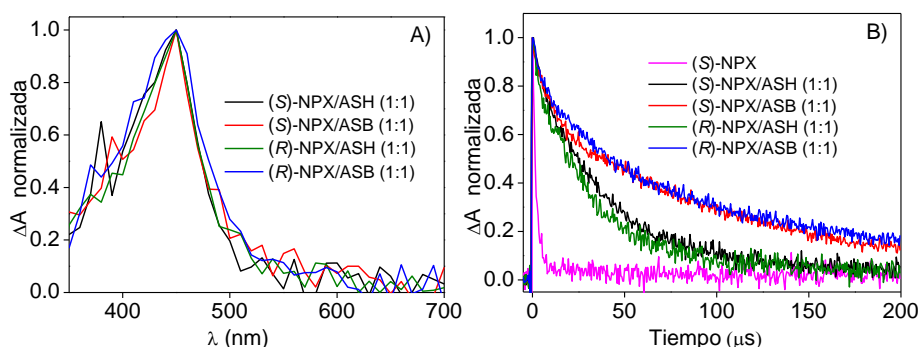


Figura 4.3. A) Espectro de FDL ($\lambda_{\text{ex}} = 308 \text{ nm}$) de (S)- y (R)-NPX ($2 \times 10^{-4} \text{ M}$, PBS 0.01 M, pH= 7.4) en presencia de diferentes AS, registrado 2 μs después del pulso del láser en condiciones aeróbicas. B) Cinéticas de desaparición del triplete a 440 nm en los distintos casos.

Es de destacar que a una proporción molar 1:1 de fármaco/proteína, las cinéticas de desaparición fueron más largas y se ajustaron considerando dos términos monoexponenciales con la Ecuación 4.1.

$$\Delta A = \Delta A_0 + A_I e^{-t/\tau_I} + A_{II} e^{-t/\tau_{II}} \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

donde ΔA es la absorbancia del estado excitado, τ_I y τ_{II} son los tiempos de vida de triplete del NPX unido al sitio I y II de la proteína y A_I y A_{II} son los correspondientes factores preexponenciales.

Si aumentamos la proporción molar fármaco/proteína, es necesaria una ecuación con tres tiempos de vida para ajustar la cinética de desaparición (Ecuación 4.2) ya que además de las especies NPX@ASH hay que tener en cuenta que queda NPX libre en disolución.

$$\Delta A = \Delta A_0 + A_L e^{-t/\tau_L} + A_I e^{-t/\tau_I} + A_{II} e^{-t/\tau_{II}} \quad (\text{Ecuación 4.2})$$

Los valores de A_L , A_I y A_{II} correspondientes al fármaco libre en disolución, unido al sitio I y unido al sitio II, respectivamente, se determinaron mediante un análisis de regresión de las cinéticas de desaparición de NPX/AS en un rango de proporciones molares 1:0.15 hasta 1:1.

En la Tabla 4.1 se muestran los tiempos de vida de triplete obtenidos para distintas combinaciones NPX/AS y además en la Figura 4.4 se puede observar la distribución del fármaco a varias relaciones molares de NPX/AS.

Tabla 4.1. Tiempos de vida del estado excitado triplete, determinados por FDL, del (S)- y (R)-NPX unido a la ASH y a la ASB, en relación molar 1:1.

Fármaco	Proteína	τ_I (μs)	τ_{II} (μs)
(S)-NPX	ASH	10.1	48.3
(S)-NPX	ASB	5.0	76.0
(R)-NPX	ASH	7.5	37.7
(R)-NPX	ASB	7.0	69.1

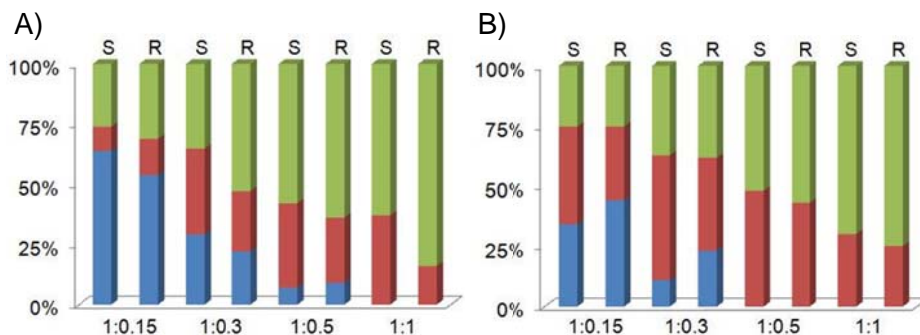


Figura 4.4. Porcentaje de fármaco libre (azul), unido al sitio I (rojo) y unido al sitio II (verde) para el (S)- o (R)-NPX a diferentes relaciones molares. A) NPX/ASH y B) NPX/ASB.

Sin embargo, en presencia de AAG se observó un comportamiento diferente del fármaco, ya que el grado de unión fue significativamente inferior. Por tanto, con cantidades equimolares de proteínas, las cinéticas de desaparición se ajustaron a dos tiempos de vida de triplete correspondientes a la especie libre en disolución (τ_L) y unida a proteína (τ_U) como se muestra en la Ecuación 4.3.

$$\Delta A = \Delta A_0 + A_L e^{-t/\tau_L} + A_U e^{-t/\tau_U} \quad (\text{Ecuación 4.3})$$

Al igual que en el caso anterior, el análisis de regresión de las cinéticas de desaparición de NPX/AAG permitió determinar los correspondientes factores preexponenciales A_L y A_U .

En la Tabla 4.2 se recogen los tiempos de vida y los porcentajes de ocupación para todas las combinaciones NPX/AAG. Estos valores revelan que no hay estereodiferenciación entre los dos enantiómeros del NPX y una capacidad de unión superior hacia la proteína bovina.

Tabla 4.2. Tiempos de vida de triplete y porcentaje de unión, a relación molar 1:1, del (S)- y (R)-NPX a la AAGH y a la AAGB, determinados por FDL.

Fármaco	Proteína	τ_U (μ s)	% Fármaco unido
(S)-NPX	AAGH	21.9	19
(S)-NPX	AAGB	26.7	57
(R)-NPX	AAGH	22.7	19
(R)-NPX	AAGB	30.1	47

Por otra parte, una vez evaluadas las interacciones del NPX con las AS y las AAG por separado se procedió al estudio de la situación en la que las dos proteínas estaban presentes simultáneamente. Para ello se prepararon disoluciones de (S)- y (R)-NPX en presencia de AS y AAG a una relación molar 1:0.5:0.5 y se sometieron a FDL a una $\lambda_{ex} = 308$ nm. Las cinéticas de desaparición monitorizadas a 440 nm se analizaron utilizando la Ecuación 4.4.

$$\Delta A = \Delta A_0 + A_L e^{-t/\tau_L} + A_U e^{-t/\tau_U} + A_I e^{-t/\tau_I} + A_{II} e^{-t/\tau_{II}} \quad (\text{Ecuación 4.4})$$

donde τ_L , τ_U , τ_I y τ_{II} corresponden al tiempo de vida de triplete de la especie en disolución, unida a la AAG o unida al sitio I y II de la AS, respectivamente.

Las cinéticas de desaparición del (S)- y (R)-NPX unido a las proteínas humanas se pueden ver en la Figura 4.5.

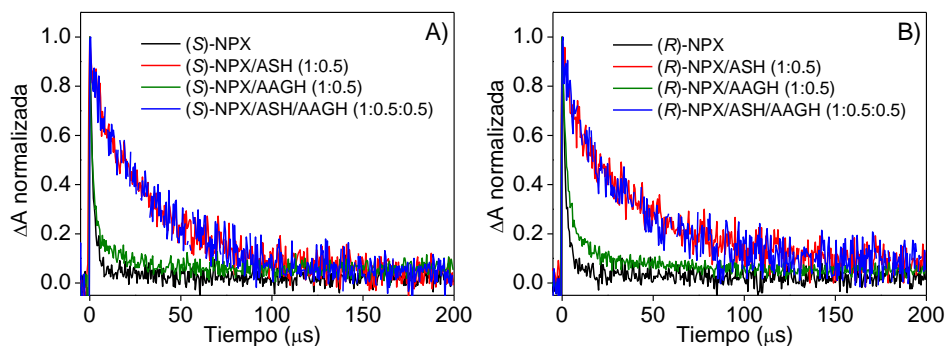


Figura 4.5. Cinéticas de desaparición de la señal a 440 nm ($\lambda_{ex} = 308$ nm) de A) (S)-NPX y B) (R)-NPX (2×10^{-4} M, PBS 0.01 M, pH = 7.4, aire) en presencia de ASH y AAGH.

Puesto que ambos enantiómeros tienen una mayor afinidad por la albúmina, las cinéticas que se obtuvieron para los sistemas binarios resultaron ser muy parecidas a la de las mezclas NPX/ASH, lo que indicó que la presencia de AAGH no afecta a la cinética de desaparición del fármaco unido a ASH. Al ajustar las cinéticas de desaparición aplicando la Ecuación 4.4 se confirmó que la cantidad de fármaco unido a AAGH era casi insignificante.

Curiosamente, en el caso de las proteínas bovinas, se observó una situación diferente. Asumiendo que la relación A_I/A_{II} se mantiene constante en las mezclas 1:0.5 NPX/ASB y fijando los tiempos de vida de triplete del NPX determinados en la AAGB y la ASB por separado, el ajuste de las cinéticas de desaparición utilizando la Ecuación 4.4 permitió determinar el porcentaje de NPX que queda libre en disolución y el que está complejado con cada una de las proteínas.

El porcentaje de fármaco complejo con proteínas se recoge en la Figura 4.6 y pone de manifiesto que la ASB es la principal proteína transportadora del NPX, aunque la AAGB compite en cierta medida cuando ambas proteínas están presentes en el mismo medio.

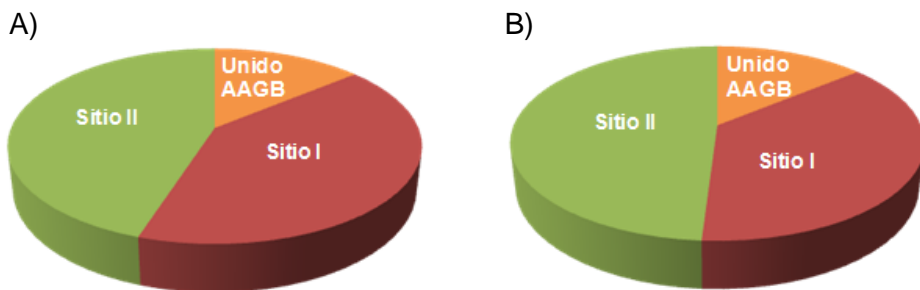


Figura 4.6. Porcentaje de unión a la AAGB (naranja), al sitio I (rojo) y al sitio II (verde) del NPX en sistemas binarios AS/AAG en relación molar 1 : 0.5 : 0.5 determinados por FDL. A) (S)-NPX y B) (R)-NPX.

4.2.2.- Unión de PPN a proteínas

Al igual que en el caso anterior, para evaluar el comportamiento del PPN en presencia de las AS y AAG, se aplicó la misma metodología apreciándose ciertas singularidades.

Experimentos de FDL excitando a 308 nm del (S)- y el (R)-PPN en disoluciones de PBS en condiciones aeróbicas revelaron la generación de dos especies transitorias. La banda de absorción con máximo a 420 nm se atribuye a la transición triplete-triplete y la otra corresponde al catión radical. Los tiempos de vida fueron de 1.8 μ s y de 13.5 μ s para el estado excitado triplete y para el catión radical respectivamente.

Peculiarmente, las cinéticas de desaparición monitorizadas a 420 nm en presencia de AS son prácticamente coincidentes con las encontradas para el PPN libre en disolución, lo que pone de manifiesto que no se produce la inclusión del fármaco en la proteína incluso a relaciones molares de fármaco/AS altas.

Por contra, en presencia de AAG, el comportamiento cinético es muy diferente ya que las cinéticas de desaparición fueron más largas y para obtener un buen ajuste se necesitó una expresión con tres términos monoexponenciales como la Ecuación 4.5.

$$\Delta A = \Delta A_0 + A_L e^{-t/\tau_L} + A_{CR} e^{-t/\tau_{CR}} + A_U e^{-t/\tau_U} \quad (\text{Ecuación 4.5})$$

donde τ_L , τ_{CR} y τ_U corresponden al tiempo de vida triplete de la especie libre en disolución, al del catión radical y al fármaco que está unido a la AAG respectivamente.

El análisis de regresión de las cinéticas de desaparición para diferentes mezclas de PPN/AAG permitió determinar los factores preexponenciales correspondientes al fármaco libre en disolución y unido a la proteína respectivamente cuyos porcentajes se muestran en la Figura 4.7.

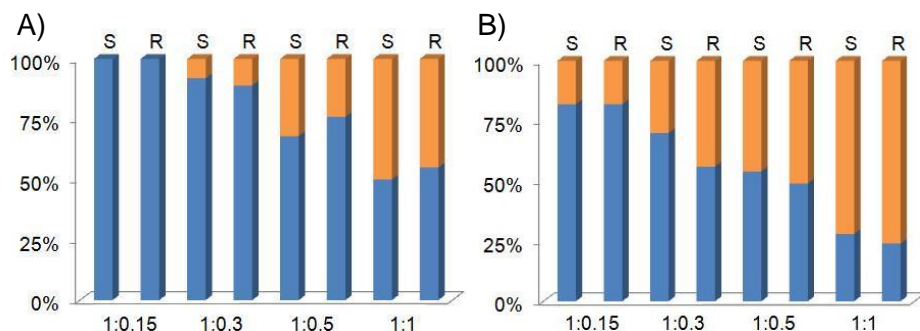


Figura 4.7. Porcentaje de (S)- y (R)-PPN libre (azul) y unido a AAG (naranja) a diferentes relaciones molares. A) PPN/AAGH y B) PPN/AAGB.

En la Tabla 4.3 se recopilan los tiempos de vida de triplete y los porcentajes de ocupación para todas las combinaciones PPN/AAG, los cuales revelan que no hay estereodiferenciación entre ambos enantiómeros y una capacidad de unión superior hacia la proteína bovina.

Tabla 4.3. Tiempos de vida del estado excitado triplete y porcentaje de unión, a relación molar 1:1, del (S)- y (R)-PPN a la AAGH y a la AAGB, determinados por FDL.

Fármaco	Proteína	τ_U (μ s)	% Fármaco unido
(S)-PPN	AAGH	43.2	50
(S)-PPN	AAGB	46.5	72
(R)-PPN	AAGH	45.5	45
(R)-PPN	AAGB	45.6	76

Una vez interpretadas las interacciones del PPN con la AS y con la AAG de forma independiente se procedió al estudio de la situación en la que ambas proteínas están presentes simultáneamente. Para ello se prepararon disoluciones de (S)- y (R)-PPN en presencia de AS y AAG a

una relación molar 1:0.5:0.5 y se sometieron a FDL a una longitud de onda de excitación de 308 nm registrándose las cinéticas a 420 nm.

Las cinéticas de desaparición de los dos enantiómeros del PPN unidos a diferentes proteínas se pueden ver en la Figura 4.8.

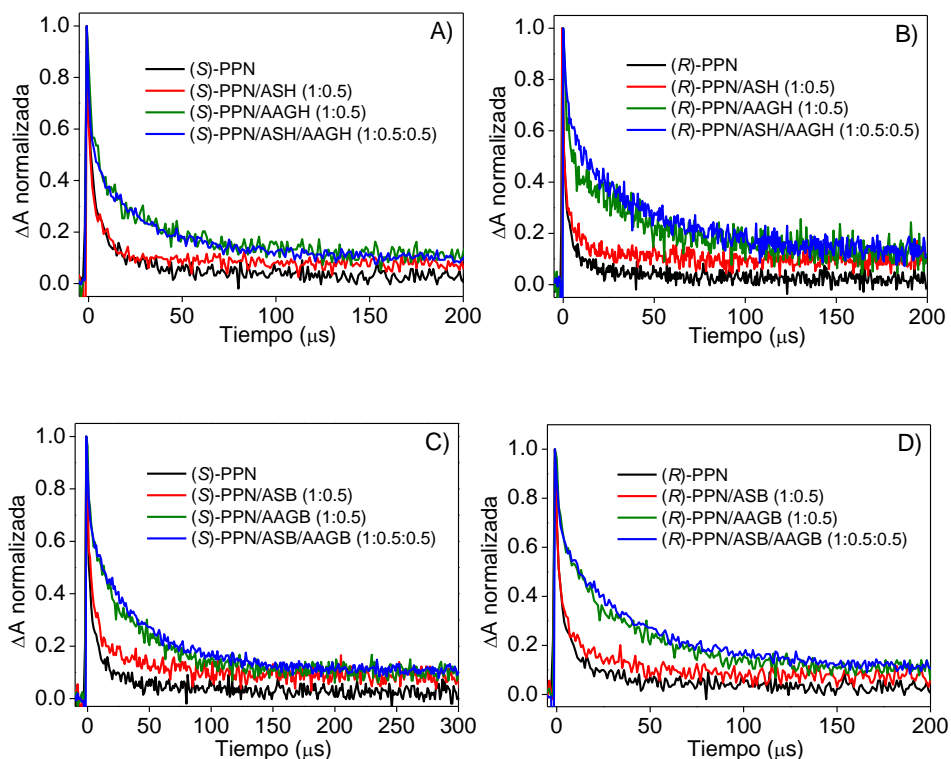


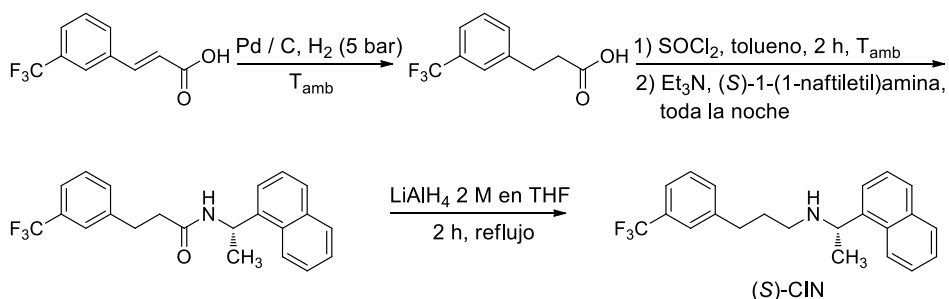
Figura 4.8. Cinéticas de desaparición de la señal ($\lambda_{ex} = 308$ nm) a 420 nm del PPN (2×10^{-4} M, PBS 0.01 M, pH = 7.4, aire). A) (S)-PPN/proteínas humanas, B) (R)-PPN/proteínas humanas, C) (S)-PPN/proteínas bovinas y D) (R)-PPN/proteínas bovinas.

Dado que ambos enantiómeros presentan una mayor afinidad por la AAG, las cinéticas que se obtuvieron para los sistemas binarios fueron iguales a la de las mezclas PPN/AAG. Por tanto, la presencia de AS no afecta a la cinética de desaparición de los complejos

fármaco@AAG. Los resultados obtenidos confirmaron que la cantidad de fármaco unido a AS era casi despreciable.

4.2.3.- Unión de CIN a proteínas

Con el fin de evaluar la interacción de los dos enantiómeros del CIN con las 4 proteínas anteriormente estudiadas, se procedió a sintetizar el enantiómero (S)-CIN, ya que no es comercial. Se preparó como se indica a continuación en el Esquema 4.1.¹⁶⁰



Esquema 4.1. Síntesis del (S)-CIN.

Como consecuencia de la escasa solubilidad del CIN en PBS, los experimentos de FDL se realizaron a una longitud de onda de excitación de 266 nm (en vez de 308 nm como en los casos anteriores) donde el cromóforo absorbe más y se necesita una menor cantidad de fármaco para obtener una absorbancia dada. Inmediatamente después del pulso del láser se registró el espectro de absorción transitoria, asignándose la banda con máximo a 420 nm a la absorción triplete-triplete¹⁵⁹ cuyo tiempo de vida, en condiciones aeróbicas, resultó ser de 1.9 μ s.

Por otra parte, tras la adición de diferentes cantidades de AS o AAG la cinética de desaparición del estado excitado triplete fue más lenta. Sin embargo, puesto que bajo estas condiciones se excita tanto al

fármaco como a la proteína, se podría pensar que hay una posible interferencia del Trp. Este fenómeno se descartó, ya que en experimentos de fluorescencia vistos anteriormente¹⁵⁹ se ha comprobado que no hay TE singlete-singlete de la proteína al fármaco.

En la Figura 4.9 se muestra tanto el espectro de absorción transitoria de la ASH como el del CIN en PBS. En ella se evidencia que la proteína por sí sola no da lugar a ninguna especie detectable que pueda interferir con la banda correspondiente a la absorción triplete-triplete del CIN en las condiciones experimentales utilizadas.

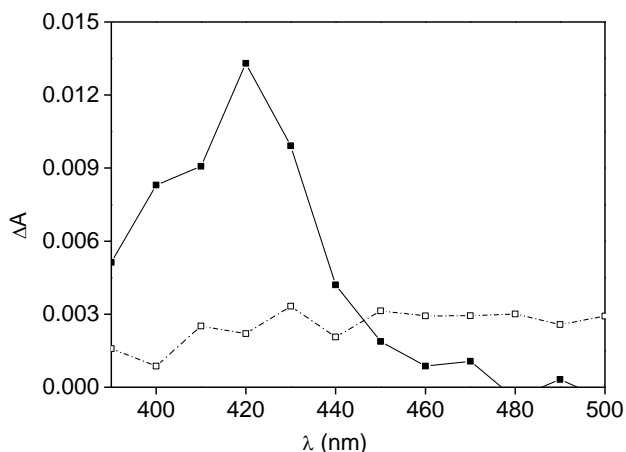


Figura 4.9. Espectros de FDL ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$, PBS, aire) de una disolución $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ de (S)-CIN (■) y de una disolución $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ de ASH (□) registrados $0.5 \mu\text{s}$ después del pulso del láser.

Al igual que en el caso del NPX, con el tratamiento de las cinéticas de desaparición mediante las Ecuaciones 4.2 (AS) y 4.3 (AAG) se determinaron tanto los tiempos de vida de triplete recopilados en la Tabla 4.4 como el porcentaje de unión del CIN a las distintas proteínas (ver Figura 4.10). La asignación de los sitios de unión I y II del CIN en

las AS se logró utilizando la metodología basada en el uso de sondas de desplazamiento selectivas: warfarina para el sitio I e ibuprofeno para el sitio II.^{161,162}

Tabla 4.4. Tiempos de vida de triplete del (S)- y (R)-CIN unido a las AS y a las AAG, determinados por FDL a una relación molar 1:1 de fármaco y proteína.

Fármaco	Proteína	τ_I (μ s)	τ_{II} (μ s)	Proteína	τ_U (μ s)
(S)-CIN	ASH	6.8	36.3	AAGH	15.0
(S)-CIN	ASB	7.0	58.0	AAGB	20.0
(R)-CIN	ASH	5.0	30.1	AAGH	21.0
(R)-CIN	ASB	7.1	65.4	AAGB	30.0

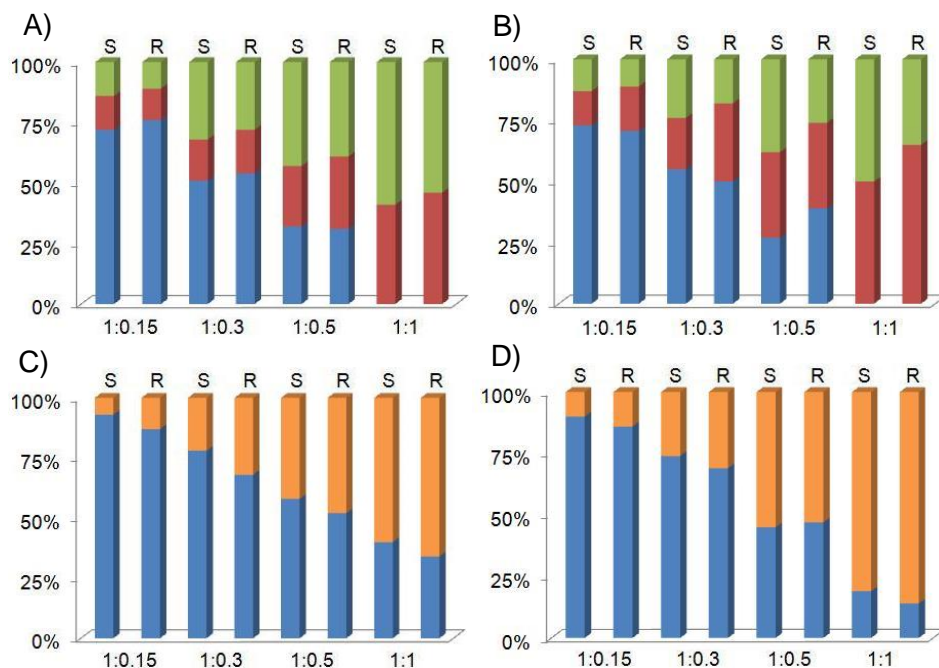


Figura 4.10. Porcentaje de (S)- y (R)-CIN libre (azul), unido al sitio I (rojo) y unido al sitio II (verde) a diferentes relaciones molares A) CIN/ASH y B) CIN/ASB. Porcentaje de (S)- y (R)-CIN libre (azul) y unido a AAG (naranja) a diferentes relaciones molares C) CIN/AAGH y D) CIN/AAGB.

Como se puede observar en la Tabla 4.4 y en la Figura 4.10, el CIN mostró una afinidad significativa por ambos tipos de proteínas transportadoras, por lo que resultó ser la sonda más adecuada para investigar su comportamiento en el sistema binario SA/AAG. Para ello, se prepararon disoluciones de (S)- y (R)-CIN en presencia de AS y AAG a una relación molar 1:0.5:0.5 y se sometieron a FDL a una longitud de onda de excitación de 266 nm. La Figura 4.11 muestra las cinéticas de desaparición del triplete monitorizadas a 420 nm.

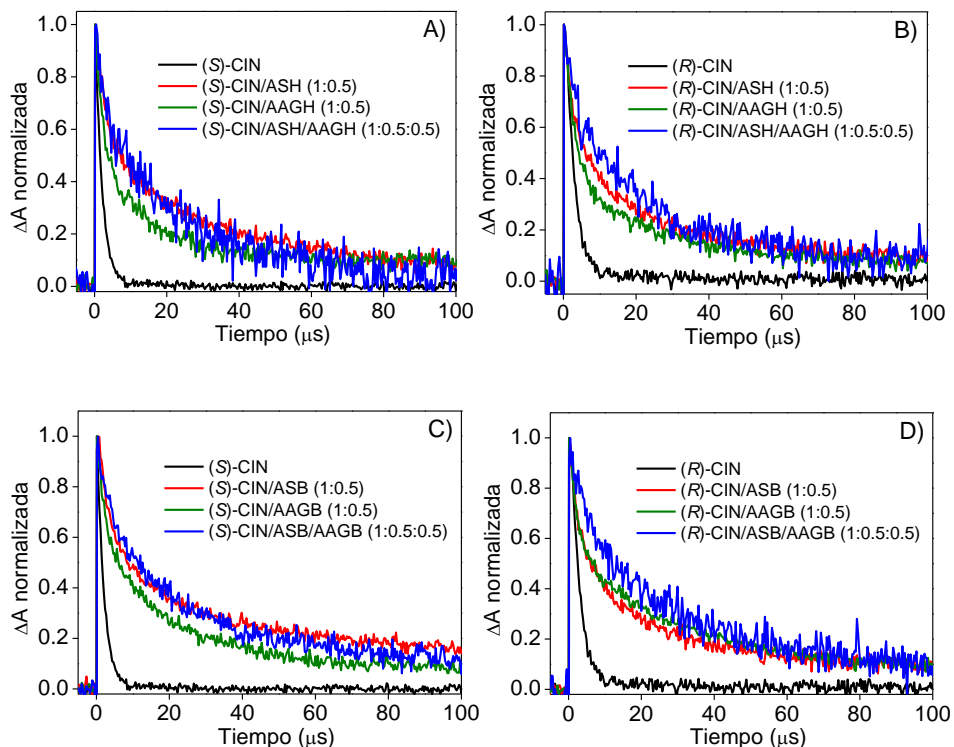


Figura 4.11. Cinéticas de desaparición de la señal a 420 nm ($\lambda_{ex} = 266$ nm) del CIN (10^{-4} M, PBS 0.01 M, pH = 7.4, aire). A) (S)-CIN/proteínas humanas, B) (R)-CIN/proteínas humanas, C) (S)-CIN/proteínas bovinas y D) (R)-CIN/proteínas bovinas.

De igual forma, asumiendo que la relación A_I/A_{II} se mantiene constante en las mezclas 1:0.5 CIN/AS y fijando los tiempos de vida triplete del CIN determinados en las AAG y las AS por separado, el ajuste de las cinéticas de desaparición utilizando la Ecuación 4.4 permitió determinar A_L , A_U , A_I y A_{II} así como el porcentaje de CIN que queda libre en disolución y el que está complejado con cada una de las proteínas.

En la Figura 4.12 se muestra la distribución del CIN en sistemas binarios AS/AAG en relación molar 1:0.5:0.5 donde se evidencia que el CIN se une tanto a las AS y como a las AAGH cuando ambas están presentes simultáneamente en el mismo medio.

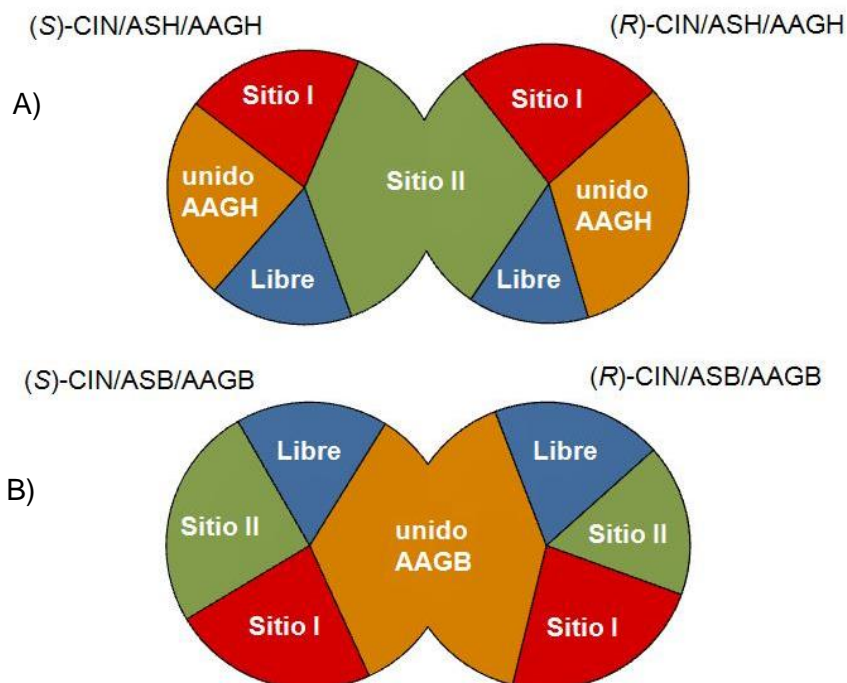


Figura 4.12. Distribución del CIN en sistemas binarios AS/AAG en relación molar 1:0.5:0.5. CIN libre (azul), CIN unido a AAG (naranja), CIN unido al sitio I (rojo) y CIN unido al sitio II (verde). A) Proteínas humanas y B) Proteínas bovinas.

4.3. Conclusiones

Mediante la técnica de FDL y usando la absorción triplete-triplete del cromóforo NP como sonda, se ha logrado determinar “*in situ*” el grado de unión de varios fármacos en sistemas binarios, donde dos proteínas diferentes, la AS y AAG están presentes simultáneamente en el medio. Esta metodología es simple, rápida y evita contaminaciones o posibles artefactos resultado de la manipulación de la muestra, ya que el procedimiento se basa en la determinación de los porcentajes de fármaco en los diferentes compartimentos biológicos disponibles en sistemas binarios AS/AAG a partir de los ajustes de las curvas de desaparición de triplete.

A pesar de que los tres fármacos estudiados (CIN, NPX y PPN) comparten como cromóforo un grupo NP, presentan un comportamiento de unión a proteínas muy diferente. Así, mientras que el NPX se une preferentemente a las AS, el PPN muestra una mayor afinidad por las AAG, siendo el CIN una situación intermedia ya que se une de manera eficiente a ambas proteínas.

4.4. Procedimiento experimental

4.4.1.- Materiales y disolventes

Las albúminas séricas (ASH (96 al 99%), ASB (98 - 99%)) y las α -glicoproteínas ácidas (AAGH (99%), y AAGB (99%)) fueron adquiridas en Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El tampón fosfato salino (PBS,

pH = 7.4, 0.01 M) se preparó por disolución de la cantidad adecuada de tabletas de Sigma en agua desionizada. Los enantiómeros puros (S)-NPX, (R)-NPX, (S)-PPN y (R)-PPN se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), mientras que (R)-CIN fue extraído del medicamento comercial Mimpara 60 mg (Amgen, España) como se ha comentado en el capítulo anterior. El (S)-CIN fue sintetizado como se ha descrito anteriormente (Esquema 4.1).

4.4.2.- Medidas de fotólisis de destello láser

Para la determinación típica del grado de unión de un fármaco a una proteína en una mezcla 1:1 se prepararon muestras que contenían 1600 μL de una disolución de fármaco en PBS de concentración 2×10^{-4} M y 400 μL de una disolución de proteína en PBS de concentración 10^{-3} M. A continuación, la disolución resultante (2 mL) se colocó en una cubeta de cuarzo y se sometió a FDL. En general, las muestras reciben entre 5 y 10 pulsos para todos los experimentos cinéticos. Esta dosis de luz no produjo ninguna descomposición detectable de la muestra, según mostraron medidas de absorción UV-Vis antes y después de la fotólisis.

Las disoluciones para los sistemas que contienen fármaco/AS/AAG en un razón molar 1:0.5:0.5 se prepararon de la siguiente manera. A 1600 μL de una disolución de fármaco 2×10^{-4} M en PBS se le añadió 200 μL de una disolución de AS 1×10^{-3} M en PBS y 200 μL de una disolución de AAG 1×10^{-3} M en PBS. Las disoluciones se incubaron durante toda la noche en oscuridad a 4 °C antes de la adquisición.

4.4.3.- Síntesis del (S)-cinacalcet

La síntesis de (S)-CIN se ha logrado en tres pasos como se muestra en el Esquema 4.1. Los productos intermedios se obtuvieron, purificaron y caracterizaron completamente de la siguiente manera:

Ácido 3-[3-(Trifluorometil)fenil]propanoico

Este producto se preparó por hidrogenación catalítica del ácido 3-(trifluorometil)cinámico (150 mg, 0.69 mmol) en metanol (2 mL) y paladio sobre carbono al 10%, bajo presión de hidrógeno (5 bar), en un reactor de vidrio reforzado equipado con controlador de presión, a temperatura ambiente durante 1.5 h. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se filtró a través una capa de Celite[®], y el filtrado se destiló a presión reducida. El compuesto se obtuvo como un aceite incoloro con un rendimiento cuantitativo.

N-[1-(S)-(1-Naftiletíl)-3-[3-(trifluorometil)fenil]propanamida]¹⁶⁰

Se añadió cloruro de tionilo (0.2 mL, 2.56 mmol) gota a gota sobre una disolución de ácido 3-[3-(trifluorometil)fenil]propanoico (373 mg, 1.71 mmol) en tolueno anhidro (20 mL) a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno.

La mezcla de reacción se calentó a 75 °C en condiciones anaeróbicas durante 2 h. Una vez finalizada la reacción, el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida, para obtener un residuo que se utilizó como tal en el siguiente paso, redisolviéndolo en diclorometano (20 mL). Esta disolución se adiciona gota a gota sobre

una disolución con agitación de (S)-1-(1-naftil)etilamina (0.2 mL, 1.27 mmol) y trietilamina (0.7 mL, 5.13 mmol) en diclorometano (20 mL), enfriada a 0 °C y bajo atmósfera de nitrógeno.

La mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente, y luego, se añadió agua (15 mL). La fase orgánica se lavó con bicarbonato sódico (3 x 15 mL) y ácido clorhídrico 1 M (3 x 15 mL) para eliminar los restos de materiales de partida. A continuación, se lavó otra vez con agua, se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida obteniéndose un residuo blanco sólido que se recristalizó en una mezcla de hexano (2 mL) y acetato de etilo (3 mL) para dar la correspondiente amida (285 mg, 61 %).

(S)-Cinacalcet (N-(1S)-1-naftiletil-N-[3-(3-trifluorometilfenil)propil]amina)

El (S)-cinacalcet se sintetizó por reducción de N-[1-(S)-(1-naftiletil)-3-[3-(trifluorometil)fenil]propanamida. La amida (250 mg, 0.67 mmol) se disolvió en tetrahidrofurano anhidro (30 mL) y la disolución se mantuvo a 0 °C. A continuación, se añadieron 1.3 mL de LiAlH₄ 2 M en tetrahidrofurano (2.69 mmol), gota a gota, y la mezcla se calentó a reflujo durante 4 h. Tras dejar enfriar la disolución a temperatura ambiente, se filtró a través de una capa de Celite® y el sólido se lavó con acetato de etilo. El filtrado resultante se destiló a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna a través de gel de sílice 60 (eluyente: diclorometano/metanol/NH₄OH 15 M 98:2:0.1) para obtener (S)-cinacalcet (166 mg, 64 %) como un aceite amarillento. Las cromatografías de capa fina (CCF) se han realizado sobre cromatofolios de sílica gel 60 F₂₅₄ (eluyente: diclorometano/metanol/NH₄OH 15 M

98:2:0.1), utilizando para revelar la irradiación con lámpara de UV con una longitud de onda de 254 nm.

4.4.3.1.- Caracterización

Ácido 3-[3-(trifluorometil)fenil]propanoico. $^1\text{H-RMN}$ resultó ser coincidente con el descrito previamente. $^{160}\text{ }^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75MHz) δ 30.3, 35.4, 123.3, 125.1, 129.1, 130.8, 131.8, 141.1, 179.1.

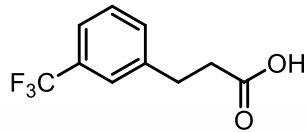
N-[1-(S)-(1-Naftiletil)-3-[3-(trifluorometil)fenil]propanamida. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.62 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 2.48 (m, 2H), 3.07 (m, 2H), 5.58 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.94 (m, 1H), 7.32 - 8.10 (m, 11H). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 20.6, 31.3, 38.0, 44.7, 122.5, 123.1, 123.3, 125.0, 125.2, 125.9, 126.6, 128.4, 128.8, 128.9, 130.6, 131.1, 132.0, 134.0, 138.0, 141.7, 170.3.

(S)-Cinacalcet (N-(1S)-1-napftiletil-N-[3-(3-trifluorometilfenil)propilamina) $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 1.40 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 1.73 (Quint, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.55 (m, 4H), 4.52 (q, $J = 6.4$ Hz, 1H), 7.16-7.45 (m, 7H), 7.55 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.77 (dd, $J = 7.2$ y 2.4 Hz, 1H), 8.09 (dd, $J = 9.3$ y 1.5 Hz, 1H). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 23.5, 31.9, 33.5, 47.4, 53.8, 122.7, 122.8, 123.0, 125.1, 125.4, 125.7, 125.8, 127.2, 128.7, 129.0, 130.6, 131.4, 131.8, 134.0, 141.2, 143.1. Masa exacta: calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NF}_3$ (MH^+) 358.1783 encontrada 358.1779.

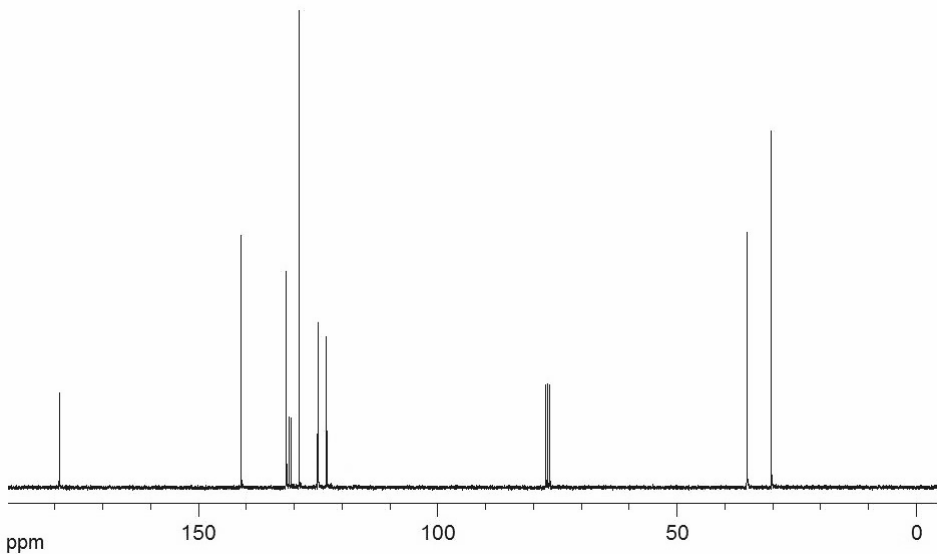
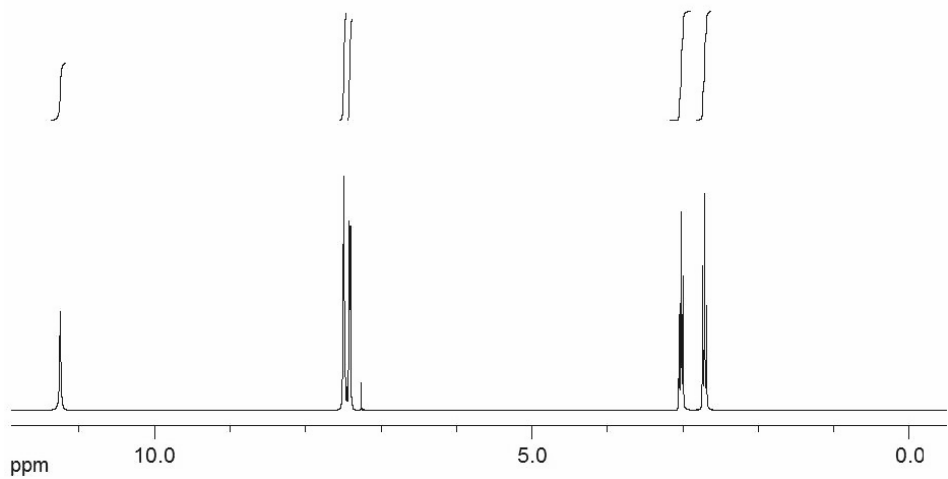
4.5. Anexo Capítulo 4

4.5.1.- Espectros ^1H y ^{13}C -RMN

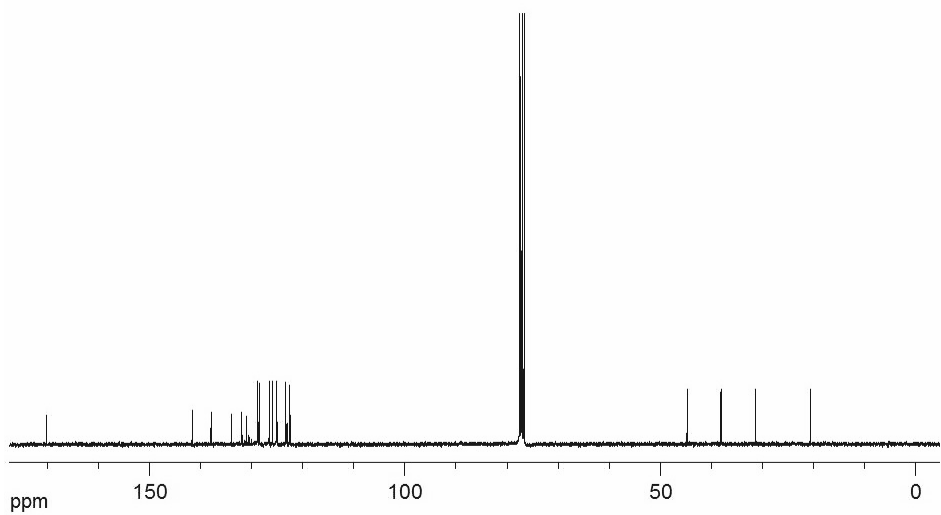
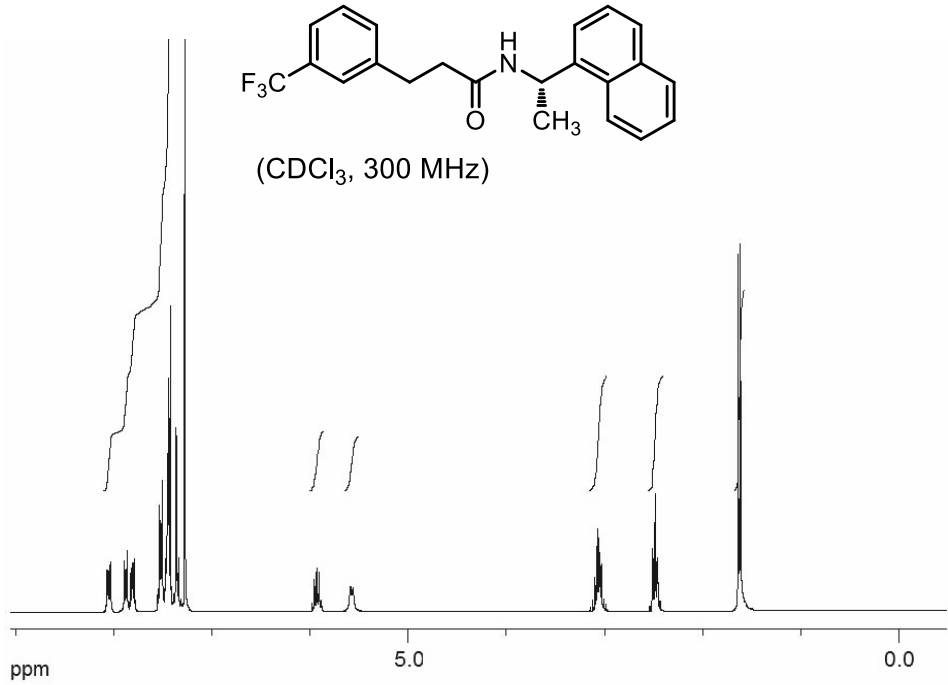
^1H y ^{13}C -RMN del ácido 3-[3-(trifluorometil)fenil]propanoico



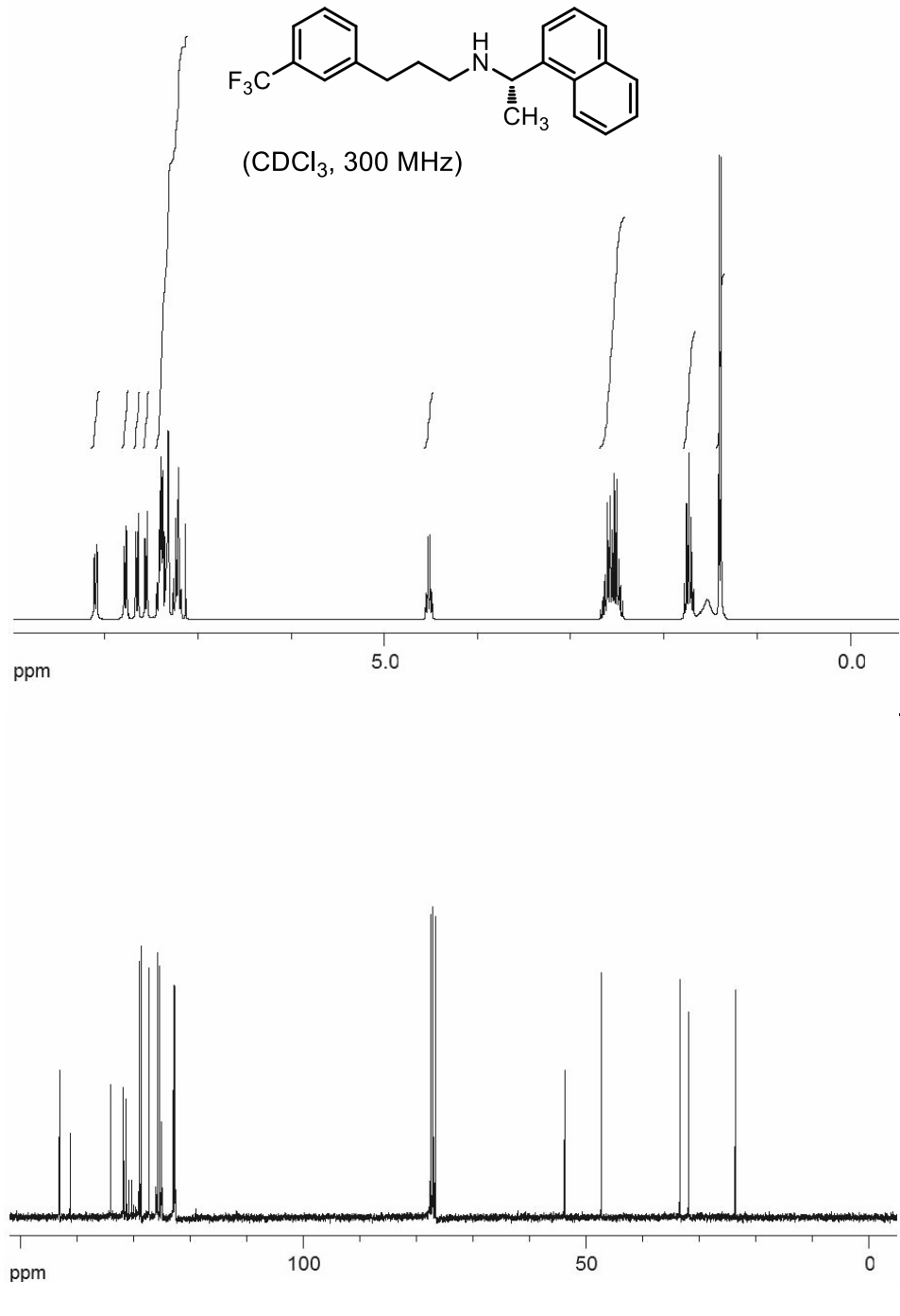
(CDCl_3 , 300 MHz)



^1H y ^{13}C -RMN de *N*-[1-(*S*)-(1-Naftiletil)-3-[3(trifluorometil)fenil]propanamida.



^1H y ^{13}C -RMN de (S)-CIN



**Capítulo 5. Interacciones fármaco - fármaco en α -
glicoproteína ácida (AAG)**

5.1. Introducción

El fenómeno de las interacciones fármaco - fármaco (IFF) se está convirtiendo en un problema común en la medicina moderna y en el desarrollo de nuevos fármacos. Se denomina IFF o interacción farmacológica a la modificación del efecto de un fármaco por la administración conjunta de otro.¹⁶³⁻¹⁶⁶ El resultado de estas interacciones puede producir efectos beneficiosos favorables para el paciente, pero también efectos no deseados, tales como pérdida de propiedades terapéuticas o toxicidad. Por ejemplo, el origen de muchos ingresos hospitalarios son las IFF, ya que pueden estar asociadas con episodios clínicos severos o incluso mortales.¹⁶⁷ Como consecuencia de esto, un número de fármacos ya establecidos han sido retirados del mercado después de descubrir su implicación directa en IFF no deseados. En la actualidad se consumen muchos fármacos por la población y existe una tendencia a la politerapia. En general, las IFF pueden llegar a ser de especial relevancia en pacientes de alto riesgo que estén polimedificados, situación muy común en los ancianos.¹⁶⁸ Por tanto, antes de la introducción de nuevas entidades químicas es necesaria una buena comprensión científica del potencial de las IFF.¹⁶⁹⁻¹⁷¹

En los últimos años, el mecanismo de las IFF se ha convertido en un tema actual de intensa actividad investigadora ya que engloba las interacciones farmacocinéticas¹⁷²⁻¹⁷⁴ (absorción, distribución, biotransformación y excreción) y farmacodinámicas (a nivel de receptor y efectos farmacológicos dosis-respuesta) de los fármacos. Hay que destacar que un factor clave en la farmacocinética es la unión a

proteínas plasmáticas. Aquí es donde las IFF pueden jugar un papel clínicamente significativo ya que pueden afectar a la concentración de fármaco en sangre. Así, las interacciones a nivel de proteínas transportadoras pueden conllevar una alteración en la distribución de los fármacos a los órganos diana mediante desplazamiento de los sitios de unión de las proteínas.^{175,176} Por lo tanto, la posibilidad de tener dos fármacos compartiendo el mismo sitio de unión a proteínas se debe de tener en cuenta en el caso de que ambos se unan fuertemente y tengan una ventana terapéutica estrecha. Sin embargo, la detección de las IFF no es sencilla, especialmente si se trata de una medición *in situ* no invasiva. Los métodos *in vitro* empleados incluyen tanto ensayos con células o membranas artificiales como los basados en medidas físicas, como son la RMN o la espectroscopía de fluorescencia.^{164,165} Hay que destacar que la ampliamente usada TE de resonancia de Förster (FRET) está basada en la TE singlete – singlete la cual ocurre por interacciones de tipo dipolo – dipolo y puede operar a grandes distancias entre cromóforos localizados en diferentes compartimentos biológicos. Por lo tanto, el desarrollo de estrategias apropiadas para la valoración de las IFF en el mismo sitio de unión de proteínas es un importante campo de interés que requiere un mayor esfuerzo investigador.¹⁴³

En este contexto se ha descrito la utilización de los estados excitados triplete para estudiar una serie de problemas biológicamente relevantes, basándose en el hecho de que las propiedades de estas especies transitorias (en particular, el tiempo de vida) son muy sensibles al microambiente.^{23,24,131,145-147,149,159,177,178} Por tanto, parece interesante aplicar esta metodología basada en el uso de la fotólisis de destello láser (FDL), para explotar el potencial de los estados excitados triplete

como sondas para detectar IFF dentro de proteínas. Así, la transferencia de energía triplete-triplete (TETT) entre dos fármacos diferentes que comparten un sitio de unión común puede estudiarse mediante espectroscopía de absorción transitoria, ya que este fenómeno sólo puede ocurrir a través de un mecanismo Dexter, el cual requiere una gran proximidad entre donador y receptor.

Para estudiar este proceso se han elegido la AAGH y AAGB como anfitriones biológicos, debido a su capacidad de unirse a ligandos tanto endógenos como exógenos. Como ya se mencionó en la introducción, a pesar de que se han descrito varios sitios de unión para AAG, sólo uno de ellos es de alta afinidad y es el encargado de transportar la mayoría de moléculas. Se trata de un sitio de unión grande y flexible para la mayoría de fármacos y moléculas orgánicas pequeñas. El resto de sitios de unión son de baja afinidad y su influencia en la función de transporte de sustratos se considera despreciable.^{57-60,64,65,67,179} La naturaleza hidrofóbica de los sitios de unión de la AAGH y AAGB es similar aunque sus microviscosidades son marcadamente diferentes.⁷³

Los fármacos seleccionados para investigar las IFF son el CIN, el PPN y la NAB cuyas estructuras se muestran en la Figura 5.1. Todos ellos presentan como cromóforo un grupo NP el cual es apropiado para la generación y la detección del estado excitado triplete. Además, las distintas sustituciones en dicho grupo hacen que tanto la posición del máximo en el espectro de absorción transitoria como su energía de triplete sea diferente, lo cual hace posible un proceso de TETT y facilita su monitorización por FDL.

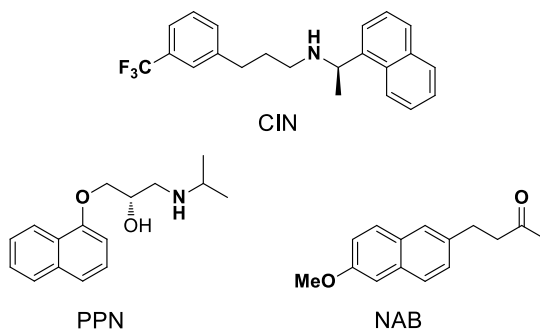


Figura 5.1. Estructura química del CIN, NAB y PPN.

Como ya se ha comentado anteriormente, el CIN en la sangre, a dosis terapéuticas, se encuentra cuantitativamente unido a proteínas transportadoras.¹¹³ El PPN se une fuertemente a AAGH con una constante de asociación de $K_B = 4.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.¹⁵⁸ La administración conjunta de ambos fármacos constituye un caso real de IFF, siendo la ansiedad, diarrea y astenia los efectos secundarios más comunes que experimentan los pacientes.¹⁸⁰ Por último, la NAB es utilizado para la reducción del dolor y la inflamación asociados con la artritis.¹⁸¹

5.2. Resultados y discusión

5.2.1.- Medidas de fosforescencia

Con el fin de examinar la viabilidad de TETT entre los fármacos seleccionados, se registraron los espectros de fosforescencia en matriz rígida de etanol a 77 K tras excitar a 308 nm (ver Figura 5.2). Las energías de triplete (E_T) que se determinaron fueron $60.9 \text{ kcal mol}^{-1}$, $61.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ y $62.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ para el CIN, el PPN y la NAB

respectivamente. Por tanto, en principio, debería ser posible observar TETT desde el PPN al CIN y de la NAB al CIN.

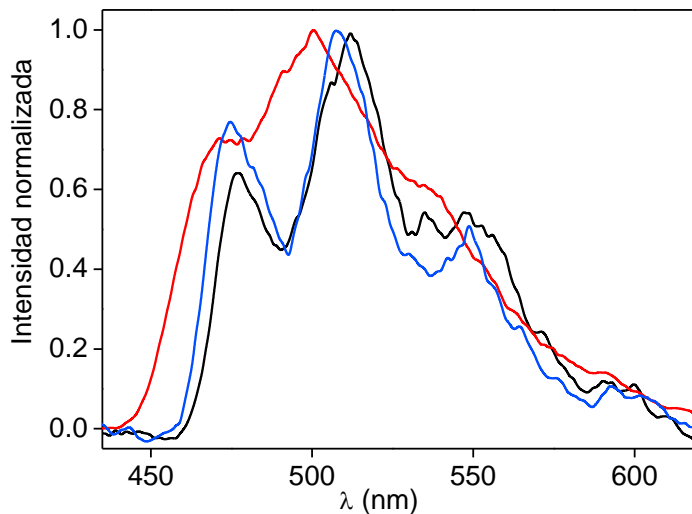


Figura 5.2. Espectro de fosforescencia normalizado de CIN (negro), PPN (azul) y NAB (rojo) en matriz rígida de etanol a 77 K. La absorbancia de las muestras se fijó a 0.8 a 308 nm.

5.2.2.- Estudio por fotólisis de destello láser

Antes de estudiar los sistemas complejos (de tres componentes) se procedió a investigar, bajo nuestras condiciones experimentales, el comportamiento de los tres fármacos por separado en ausencia de proteína, tanto en medio acuoso como orgánico. Se realizaron los estudios de FDL para el CIN, el PPN y la NAB en disoluciones de acetonitrilo (5.8×10^{-4} M) tanto en condiciones aeróbicas como purgadas con nitrógeno. Tras la excitación con el láser pulsado a 308 nm se registraron los espectros de absorción transitoria de cada uno, asignándose el máximo a 420 nm a la transición triplete-triplete del CIN

y a 450 nm para el PPN y la NAB. Los tiempos de vida de triplete (τ_T) que se determinaron fueron similares a los descritos en la literatura^{159,182} siendo, en condiciones aeróbicas, notablemente más cortos (ver Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Tiempos de vida del estado excitado triplete del CIN, PPN y NAB en diferentes medios.

Fármaco	τ_T (μs) ^a			
	Acetonitrilo/N ₂	Acetonitrilo/aire	AAGH/aire ^b	AAGB/aire ^b
CIN	4.0	0.2	5.7	10.5
PPN	6.1	0.1	25.2	51.8
NAB	10.4	0.1	16.6	25.8

^a Obtenidos tras FDL ($\lambda_{\text{ex}} = 308$ nm), ^b Sistemas fármaco@proteína a relación molar 1:1 en PBS 0.01 M.

Por otra parte, los τ_T en medio acuoso neutro no se determinaron, ya que la solubilidad del CIN y la NAB en este medio es muy reducida y no se pudieron preparar disoluciones transparentes a 308 nm con la concentración requerida. En presencia de cantidades equimolares de AAG este problema desaparece ya que no se observó turbidez indicando una eficiente encapsulación de los fármacos. Además, en la Tabla 5.1, se puede observar que, en condiciones aeróbicas, las cinéticas de desaparición fueron más largas en el microambiente proporcionado por la proteína. Otro aspecto a recalcar es que tanto la posición del máximo de absorción transitoria como τ_T del CIN unido a AAG fueron lo suficientemente diferentes de los del PPN y la NAB como para poder evaluar un posible proceso de TETT.

Una vez analizadas las interacciones de los distintos fármacos con AAG por separado, se procedió al estudio de la situación en la que ambos fármacos (pareja donador/aceptor) se encontraban encapsulados en la misma proteína y así evaluar una posible IFF. Hay que destacar que fue imposible disolver las mezclas CIN/PPN y CIN/NAB en PBS a las concentraciones requeridas ya que se obtenían suspensiones turbias. Sin embargo, la complejación con AAG se pudo seguir a simple vista ya que se produjo una completa solubilización de los fármacos dando lugar a disoluciones transparentes. En la Figura 5.3 se muestra una fotografía de las mezclas de fármacos en PBS tanto en presencia como en ausencia de proteína.

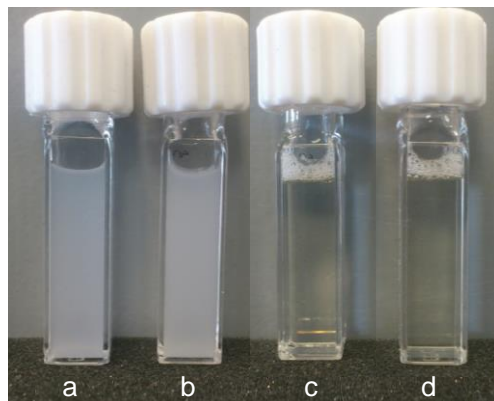


Figura 5.3. Fotografía de las mezclas de fármacos en PBS, en ausencia y en presencia de proteína. (a) CIN/PPN, (b) CIN/NAB, (c) PPN/CIN/AAGH y (d) NAB/CIN/AAGH. La concentración de cada componente fue 5.8×10^{-4} M.

Cuando se sometió a FDL una disolución de PPN/CIN/AAGH a proporción molar 1:1:1, la cinética de desaparición monitorizada a 450 nm resultó ser coincidente con la del sistema CIN/AAGH, ocurriendo una situación similar en presencia de AAGB. Esto se debe a que no hay ninguna contribución del $^3\text{PPN}^*$, lo que pone de manifiesto una

desactivación por TETT al CIN extremadamente rápida y eficiente. Esta observación indicó claramente que se estaba produciendo una IFF cuando ambos fármacos comparten el mismo sitio de unión de AAG. En la Figura 5.4 se muestran las cinéticas de desaparición normalizadas para los sistemas CIN/AAG, PPN/AAG y PPN/CIN/AAG, tanto en proteína humana como bovina.

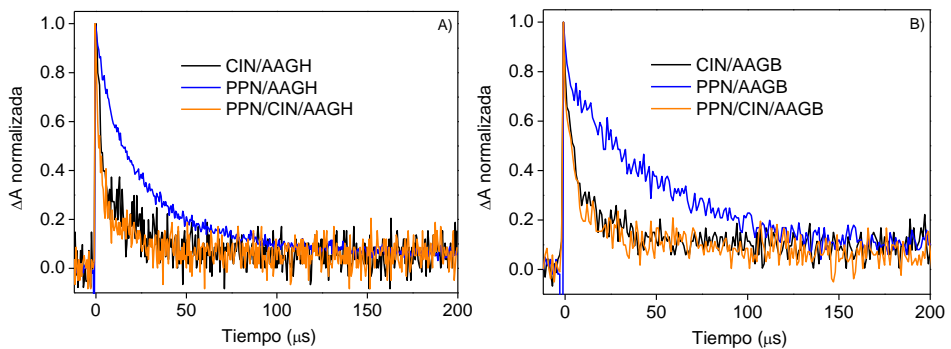


Figura 5.4. Cinéticas de desaparición normalizadas de la señal a 450 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 308$ nm) de CIN/AAG (negro), PPN/AAG (azul) y PPN/CIN/AAG (naranja). La concentración de cada componente fue 5.8×10^{-4} M. A) AAGH y B) AAGB.

Por otra parte, se repitió el estudio para las disoluciones NAB/CIN/AAG a proporción molar 1:1:1, comprobándose que las cinéticas de desaparición a 450 nm resultaron ser concordantes con las de las mezclas CIN/AAG. Así se vuelve a poner de manifiesto una IFF dentro de la proteína, ya que no existe ninguna contribución del $^3\text{NAB}^*$ en la cinética de desaparición. En la Figura 5.5 se muestran las cinéticas de desaparición normalizadas para los sistemas CIN/AAG, NAB/AAG y NAB/CIN/AAG tanto en proteína humana como bovina.

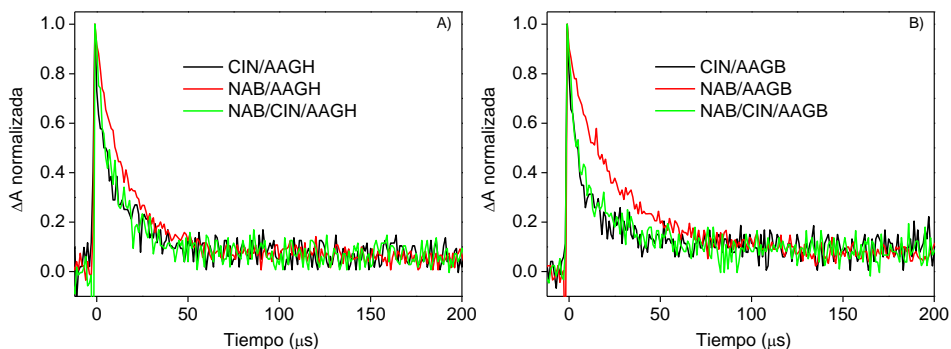


Figura 5.5. Cinéticas de desaparición normalizadas de la señal a 450 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 308$ nm) de CIN/AAG (negro), NAB/AAG (rojo) y NAB/CIN/AAG (verde). La concentración de cada componente fue 5.8×10^{-4} M. A) AAGH y B) AAGB.

Es de destacar que el proceso de TETT en los sistemas PPN/CIN/AAG y NAB/CIN/AAG se completó dentro de la duración del pulso del láser (< 20 ns). Ésto puso de manifiesto que la desactivación del estado excitado triplete del PPN o de la NAB en presencia de CIN fue muy rápida siendo su constante de velocidad (k_q) superior a 5×10^7 s^{-1} . Hay que decir que este valor de k_q no es compatible con el hecho de que el donador (PPN o NAB) y el aceptor (CIN) se acerquen por difusión para formar un complejo ya que ésta, dentro del sitio de unión de la AAG, es extremadamente lenta.

Para confirmar que la TETT es favorable dentro de AAG se realizaron cálculos teóricos para el par CIN y PPN, basados en la combinación de una metodología atómica y cuántica-semiempírica teniendo en cuenta la estructura de la AAGH (2868 átomos) determinada recientemente.¹⁸³ Las interacciones energéticas de atracción calculadas entre el CIN y el PPN y entre los fármacos asociados CIN+PPN y la AAGH fueron de -14 kJ/mol y -46 kJ/mol, respectivamente, indicando que esta proteína puede albergar en su

interior IFF debido a que su sitio de unión es grande y flexible. En la Figura 5.6 se muestra la conformación del CIN y del PPN dentro del sitio de unión de la AAGH.

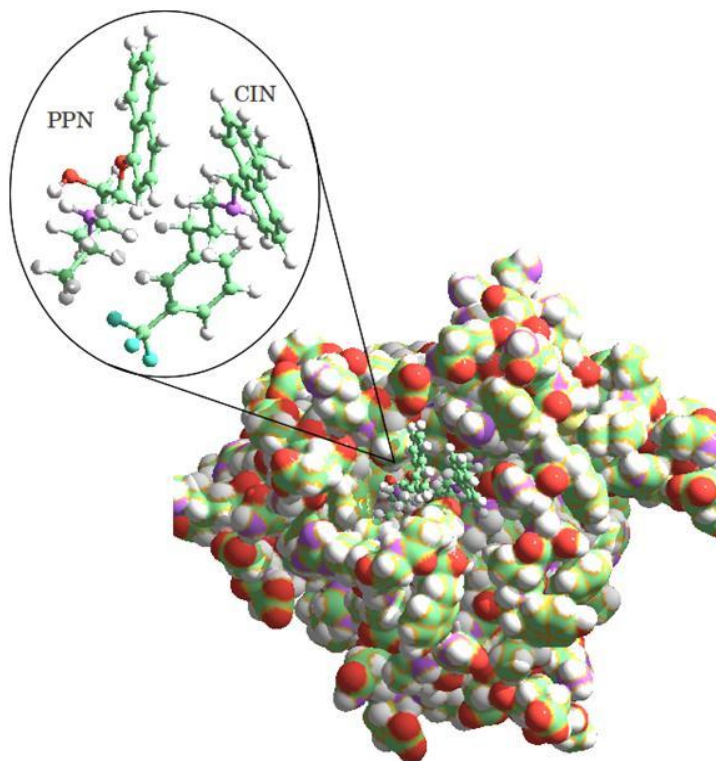
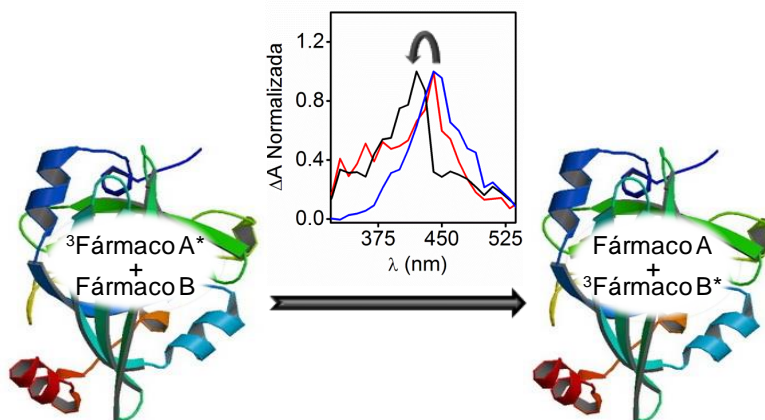


Figura 5.6. Geometría optimizada del PPN y del CIN en el sitio de unión de la AAGH.

Además, partiendo de la conformación de equilibrio encontrada (ver Figura 5.6), un método de cálculo DFT (“Density Functional Theory”) más sofisticado usando el funcional preciso M06-2X junto con el gran conjunto de base Def2-TZVP, reveló que es posible la TTET entre el PPN y el CIN debido a la gran superposición entre los orbitales moleculares pertinentes y la poca diferencia de energía existente entre ellos (ver más detallado en el material suplementario del artículo adjunto).

5.3. Conclusiones

La viabilidad de IFF dentro de los sitios de unión de las proteínas puede investigarse mediante FDL. Dicho concepto implica la detección de la TETT, la cual requiere una gran proximidad en el par donador/aceptor y sólo puede ocurrir dentro de un compartimento biológico común, como se muestra en la Figura 5.7. Esto constituye una nueva metodología, que en principio puede extenderse a una variedad de combinaciones fármaco/fármaco/biomolécula.



Fármaco A = PPN o NAB.

Fármaco B = CIN.

Figura 5.7. Representación esquemática de la utilización de TETT para detectar IFF entre dos fármacos que comparten un mismo sitio de unión de la proteína.

5.4. Procedimiento experimental

5.4.1.-Materiales y disolventes

Las α -glicoproteínas ácidas (AAGH (99 %) y AAGB (99 %), el enantiómero puro (S)-PPN y la NAB fueron adquiridas en Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El tampón fosfato salino (PBS, pH = 7.4, 0.01 M) se preparó por disolución de la cantidad adecuada de tabletas de Sigma en agua desionizada. El (R)-CIN fue extraído del medicamento comercial Mimpara 60 mg como se ha descrito en el Capítulo 3.

5.4.2.- Medidas de fosforescencia

Las medidas se realizaron en tubos de cuarzo que se introdujeron previamente en nitrógeno líquido (77 K). Las disoluciones se prepararon disolviendo los fármacos en etanol y ajustándose la absorbancia de las muestras a 0.8 aproximadamente, para la longitud de onda de excitación ($\lambda_{\text{ex}} = 308 \text{ nm}$).

5.4.3.- Medidas de fotólisis de destello láser

Todos los experimentos en presencia de proteína se llevaron a cabo en PBS bajo condiciones aeróbicas, utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico con capacidad para 4 mL.

Para la determinación típica del grado de unión de un fármaco a una proteína en una mezcla 1:1 se prepararon muestras que contenían 116 μL de una disolución de fármaco en etanol ($10 \times 10^{-3} \text{ M}$), 1160 μL de una disolución de AAG en PBS ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$) y 724 μL de PBS. Las disoluciones para los sistemas que contienen fármaco A/fármaco B/AAG a razón molar 1:1:1 se prepararon de la siguiente manera: A 1160 μL de una disolución de AAG en PBS ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$) se añadió 116 μL de una disolución de fármaco A en etanol ($10 \times 10^{-3} \text{ M}$), 116 μL de una disolución de fármaco B en etanol ($10 \times 10^{-3} \text{ M}$) y 608 μL de PBS. Las disoluciones se incubaron durante 24 horas en oscuridad antes de la adquisición.

A continuación, la disolución resultante (2 mL) se colocó en una cubeta de cuarzo y se sometió a FDL. Las cinéticas de desaparición se registraron a 450 nm. Los tiempos de vida de triplete de todas las disoluciones se determinaron por ajuste a una ecuación con un término monoexponencial.

5.4.4.- Cálculos teóricos

Los cálculos teóricos se realizaron en colaboración con Germán Sastre, Investigador Científico del Instituto Universitario Mixto de Tecnología Química (ITQ). Con el fin de modelizar la interacción espacial entre CIN/PPN y la geometría del complejo que forman con la AAGH (2868 átomos),¹⁸³ se utilizó un conjunto combinado de tres técnicas:

1. Método de Monte-Carlo con el código GULP^{184,185} para explorar el gran espacio conformacional de los sitios de unión del CIN y del PPN, por separado, a AAGH. Esta técnica no permite la optimización de geometría de ninguna de las moléculas, pero a cambio proporciona una primera exploración de todos los sitios de adsorción.
2. Técnica de minimización de la energía total¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ para optimizar todos los átomos del sistema utilizando el potencial interatómico UFF (Universal Force Field) con 1000 ciclos de optimización de la geometría, el algoritmo de descenso más rápido (steepest descent) y el software Avogadro.¹⁸⁹ En esta fase se utiliza el centro activo más favorable energéticamente para la adsorción de CIN y PPN.
3. Técnica cuántica semiempírica PM7¹⁹⁰ con el código MOPAC2012¹⁹¹ para optimizar la geometría del sitio activo de la proteína y de todos los átomos de las moléculas CIN y PPN.

Capítulo 6. Encapsulación de fármacos en micelas mixtas

6.1. Introducción

Para mejorar la biodisponibilidad de fármacos lipófilos se recurre de forma general a la encapsulación de los mismos en sistemas micelares. En este contexto, micelas mixtas (MM) compuestas por fosfolípidos y sales biliares (SB) son muy utilizadas como nanotransportadores en formulaciones farmacéuticas debido a su gran estabilidad y su reducida toxicidad.^{81,105,106,192,193} Por ejemplo, las MM han sido empleadas como vehículos adecuados de fármacos poco solubles en agua.^{106-108,110,111,194-197} Además, la capacidad de estas estructuras moleculares para mejorar las propiedades terapéuticas del fármaco encapsulado es independiente de la *vía* de administración empleada, bien sea parenteral,^{109,111,198} oral^{105,199} o cutánea.^{194,195}

Como ya se ha mencionado en el Capítulo 1, para evaluar la encapsulación de moléculas bioactivas en MM se han descrito diferentes técnicas.⁹⁰⁻⁹⁷ Sin embargo, la mayoría de éstas se basan en mediciones indirectas y no son apropiadas para informar de la accesibilidad de los fármacos dentro de MM. Por tanto, sería muy útil el desarrollo de metodologías adecuadas más directas y sensibles que permitieran evaluar este aspecto.

Recientemente se ha descrito la utilización de técnicas fotofísicas como la fluorescencia de resolución temporal y fotólisis de destello láser (FDL) para demostrar la incorporación de compuestos con diferente hidrofobicidad en agregados de SB.²⁰⁰ Asimismo, la aplicación de esta metodología a derivados fotoactivos del colesterol (Ch) ha

revelado su eficiente incorporación a MM, demostrando por tanto la gran capacidad de solubilización de estas entidades moleculares.²⁰¹

Con estos antecedentes, el objetivo del presente capítulo es evaluar la encapsulación de fármacos en nanotransportadores biomiméticos como son las MM, mediante técnicas fotofísicas como la fluorescencia y la FDL. Para ello, se han seleccionado tres fármacos administrados en la actualidad. Concretamente, se ha escogido el NPX así como su correspondiente pro-fármaco NPX(Me), el CIN y el PPN cuyas estructuras se muestran en la Figura 6.1. Todos ellos contienen como cromóforo un grupo NP el cual es apropiado para la generación y la detección del estado excitado singlete y triplete mediante fluorescencia y FDL, respectivamente.

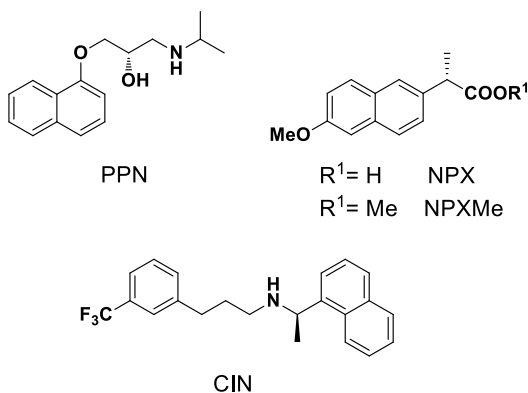


Figura 6.1. Estructura química del PPN, NPX, NPX(Me) y CIN.

6.2. Resultados y discusión

6.2.1.- Preparación de micelas mixtas

Las MM conteniendo fármaco se prepararon en un solo paso mediante el método de hidratación del “film”. En primer lugar, se adicionó una disolución de lecitina (L) y ácido cólico (AC) en metanol a otra que contenía Ch y NPX, NPXMe, PPN o CIN en diclorometano. A continuación se evaporó la mezcla de disolventes orgánicos a presión reducida para lograr la formación de una fina película sobre las paredes del recipiente de evaporación. Finalmente, la rehidratación de la película con una solución acuosa llevó a la formación de las MM con el fármaco encapsulado. En la Figura 6.2 se muestra un dibujo donde se representa la encapsulación de un fármaco dentro de la parte hidrofóbica de una MM.

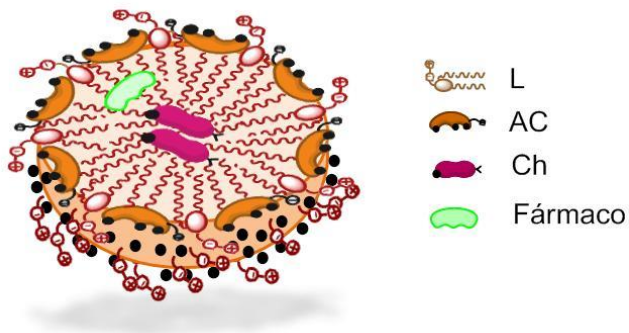


Figura 6.2. Representación de un fármaco hidrofóbico encapsulado en una MM.

Las MM obtenidas se caracterizaron por las técnicas de dispersión de luz dinámica (DLS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) como se detalla en la Figura 6.3. Cabe destacar que

ambas técnicas evidenciaron la formación mayoritaria de MM, aunque también revelaron la presencia de un porcentaje pequeño de vesículas.

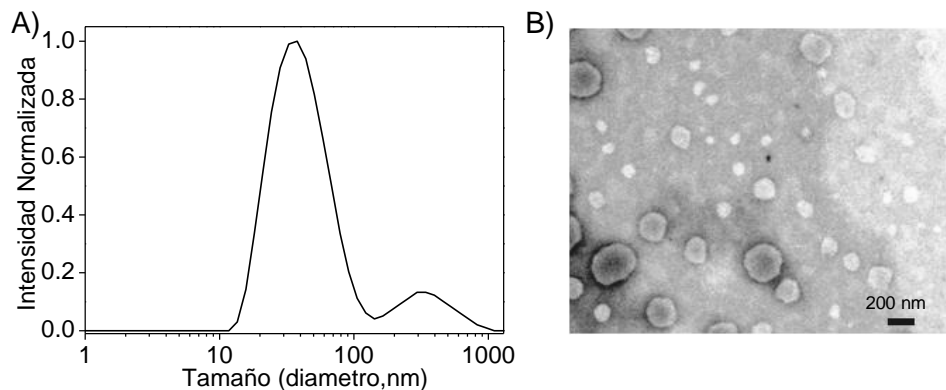


Figura 6.3. A) Curva de distribución de tamaño medida por DLS. B) Micrografía de TEM.

Por otra parte, se registraron los espectros de absorción UV-Vis de cada uno de los fármacos, tanto en disolución como encapsulado en MM. Hay que destacar que, en cada caso, la forma de éste en MM y en disolución fue idéntica.

6.2.2.- Medidas de fluorescencia

Los espectros de emisión registrados tras excitar a 290 nm muestran la banda típica del cromóforo NP; los máximos se encontraron a 356, 332 y 338 nm para el NPX, CIN y PPN, respectivamente, tanto en disolución como en MM. En el caso de NPXMe no se pudo medir su fluorescencia en disolución, debido a su insolubilidad en medio acuoso. Sin embargo, tras su encapsulación en MM se observó el máximo de emisión centrado a 350 nm (ver Figura 6.4).

Por otra parte, los tiempos de vida de singlete que se determinaron en disolución fueron 8.3 ns para el NPX, 28.6 para el CIN y 9.8 ns para el PPN. En presencia de MM no se observaron cambios significativos en el tiempo de vida por el hecho de estar encapsulados, a excepción del PPN que aumentó hasta los 14.3 ns.

Una vez registrados los espectros de emisión y determinados los τ_s de los fármacos, en disolución y dentro de MM, se procedió a evaluar el grado de encapsulación. Para ello, se realizaron medidas de desactivación de la fluorescencia tanto en el estado estacionario (ver Figura 6.4) como resuelta en el tiempo (ver Figura 6.5) en presencia de cantidades crecientes de KI (0 - 90 mM), el cual permanece principalmente en el agua. En todos los casos se observó una desactivación muy eficiente del singlete, que resultó ser de naturaleza dinámica, tal y como se muestra en la Figura 6.5.

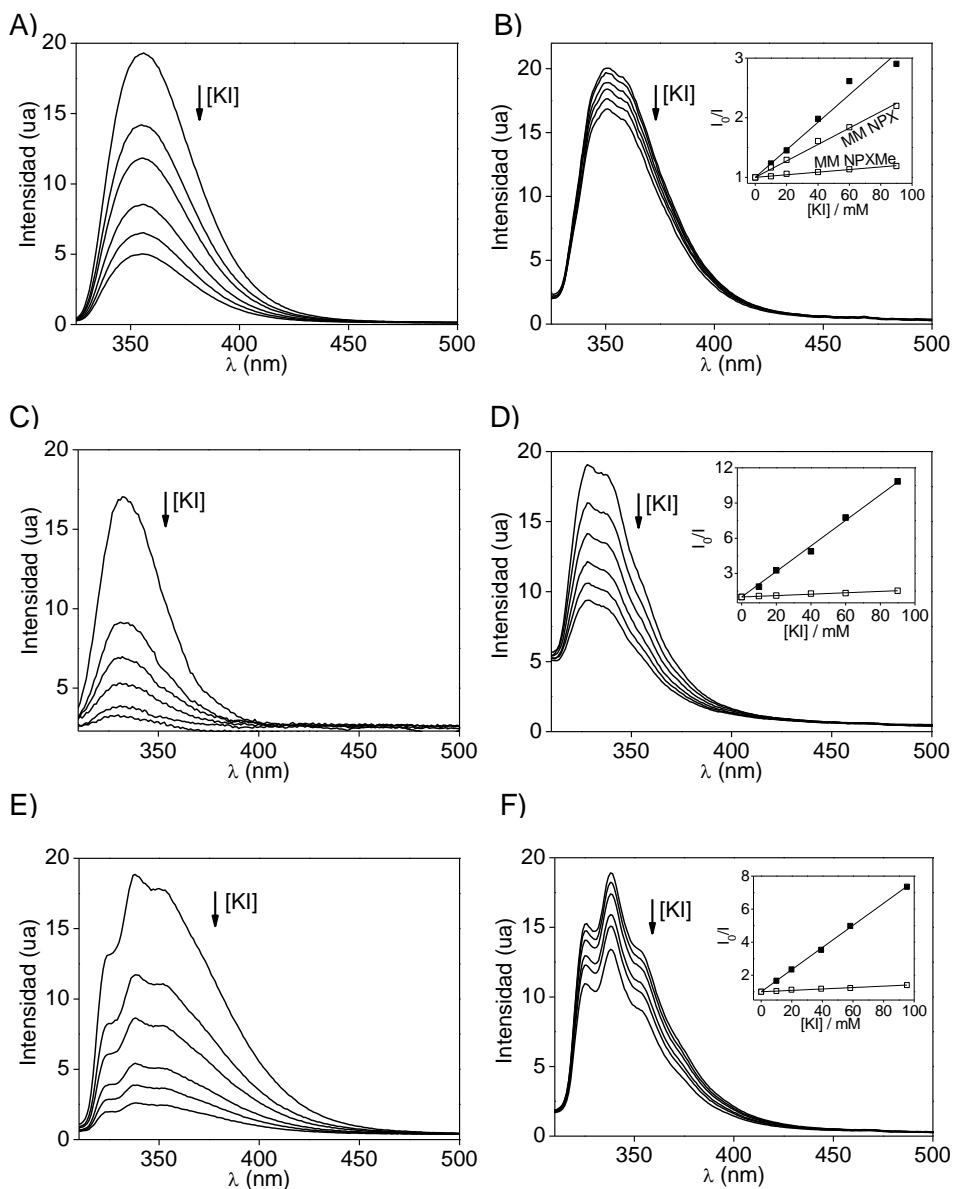


Figura 6.4. Espectros de emisión ($\lambda_{ex} = 290$ nm) en presencia de cantidades crecientes de KI (0 - 90 mM) de A) NPX en disolución acuosa NaCl 0.2 M y B) NPXMe en MM, de CIN C) en disolución acuosa NaCl 0.2 M y D) en MM, de PPN E) en disolución acuosa NaCl 0.2 M y F) en MM. La gráficas interiores son la representación Stern-Volmer en disolución (■) y en presencia de MM (□).

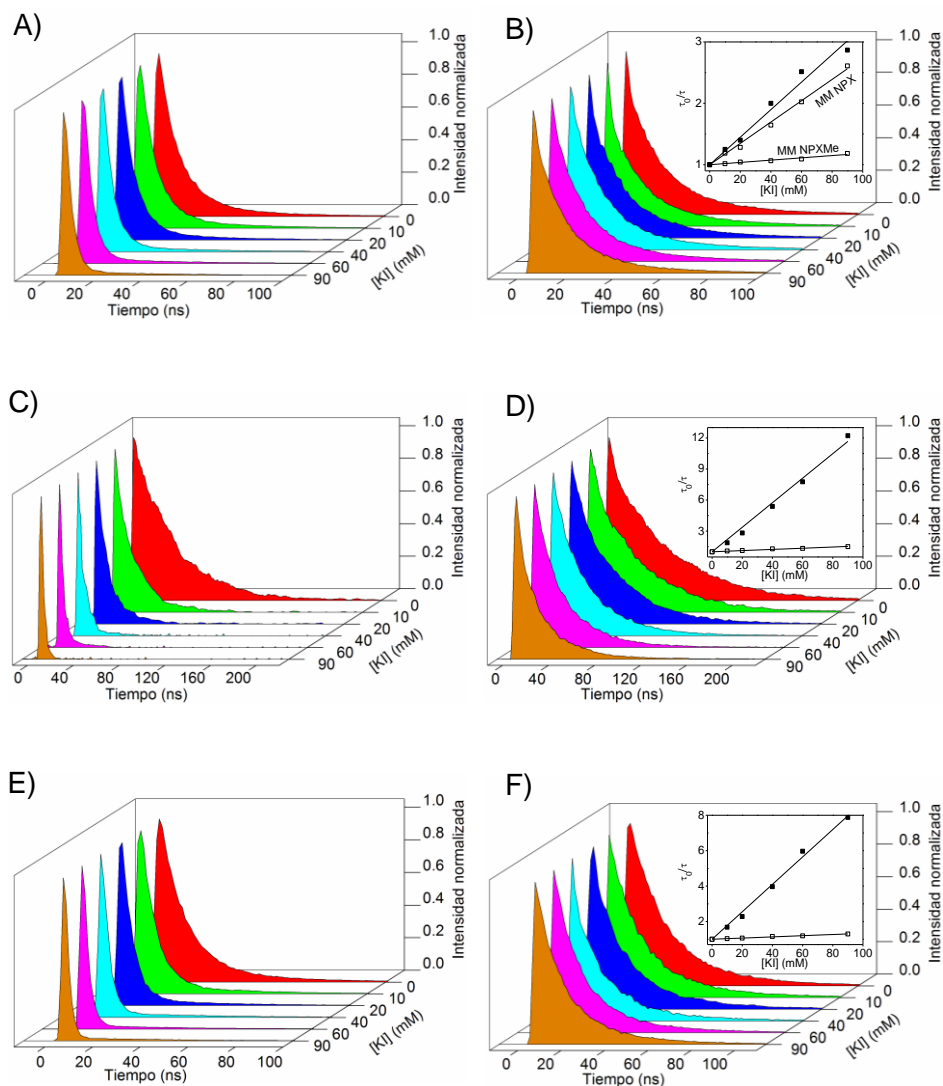


Figura 6.5. Cinéticas de desaparición ($\lambda_{ex} = 290$ nm) en presencia de cantidades crecientes de KI (0-90 mM) de A) NPX en disolución acuosa NaCl 0.2 M y B) NPXMe en MM, de CIN C) en disolución acuosa NaCl 0.2 M y D) en MM, de PPN E) en disolución acuosa NaCl 0.2 M y F) en MM. La gráficas interiores son la representación Stern-Volmer en disolución (■) y en presencia de MM (□).

Las constantes de desactivación (k_q) pudieron estimarse mediante la ecuación de Stern-Volmer (Ecuación 6.1).

$$\frac{I_0}{I} \text{ ó } \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \times \tau_0 \times [I^-] \quad (\text{Ecuación 6.1})$$

Hay que destacar que la pendiente de la recta de la representación de Stern-Volmer del NPXMe, CIN y PPN en MM resultó ser un orden de magnitud menor con respecto a la encontrada en disolución. Por tanto, los experimentos de desactivación de la fluorescencia muestran una clara evidencia de que el fármaco se ha incorporado en el interior de las MM. Sin embargo no ocurrió lo mismo para el NPX, donde esta diferencia fue menos marcada disminuyendo solo a la mitad. Estos valores están de acuerdo con lo esperado teniendo en cuenta la diferente hidrofobicidad del NPXMe, CIN y PPN en comparación con el NPX, el cual tiene un ácido carboxílico libre. A partir de estas pendientes y los tiempos de vida de singlete, se pudo calcular las k_q tanto en disolución ($k_{q,\text{dis}}$) como en MM ($k_{q,\text{MM}}$) cuyos valores se recogen en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Constantes de desactivación del estado excitado singlete por I^- .

Fármacos	$k_{q,\text{dis}} \times 10^{-9} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})^a$	$k_{q,\text{MM}} \times 10^{-9} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})^a$
NPX	2.70 ± 0.13	1.73 ± 0.05
NPXMe	-	0.15 ± 0.01
CIN	4.12 ± 0.18	0.22 ± 0.01
PPN	7.90 ± 0.17	0.24 ± 0.01

^a Los experimentos se realizaron tres veces y los errores corresponden a las desviaciones medias.

6.2.3.- Estudio por fotólisis de destello láser

Se realizaron estudios de FDL tanto para los fármacos en disolución acuosa como encapsulados en MM. Tras la excitación con el láser pulsado a $\lambda_{\text{ex}} = 266$ nm se registraron los espectros de absorción transitoria, asignándose en todos los casos el máximo a ca. 440 nm a la transición triplete-triplete. Ésta es la banda característica de los derivados de NP^{159,178} y no se observaron cambios apreciables en el espectro de absorción de los fármacos incorporados dentro de MM. En la Figura 6.6 se muestran los espectros de absorción transitoria del NPXMe, CIN y PPN en presencia de MM.

Cabe destacar el notable aumento de los τ_T del NPXMe, CIN y PPN dentro de MM lo que indicó que el estado excitado triplete es altamente sensible al microambiente y puede ser utilizado como sonda para demostrar la ubicación de fármacos dentro de MM. Con este fin, se llevaron a cabo experimentos de desactivación similares a los ya efectuados en fluorescencia. Así, se sometieron a FDL cada uno de los fármacos en MM así como en disolución. Para el estado excitado triplete el desactivante empleado fue el NaNO₂, el cual, al igual que el KI, permanece principalmente en el agua. En todos los casos, en presencia de concentraciones crecientes de NaNO₂ se observó una desactivación del triplete. Estos resultados, de nuevo, pusieron de manifiesto la limitada accesibilidad a los cromóforos en el interior de estas entidades moleculares.

En la Figura 6.6 se muestra la desactivación del estado excitado triplete por NaNO₂ de NPXMe, CIN y PPN encapsulados en MM.

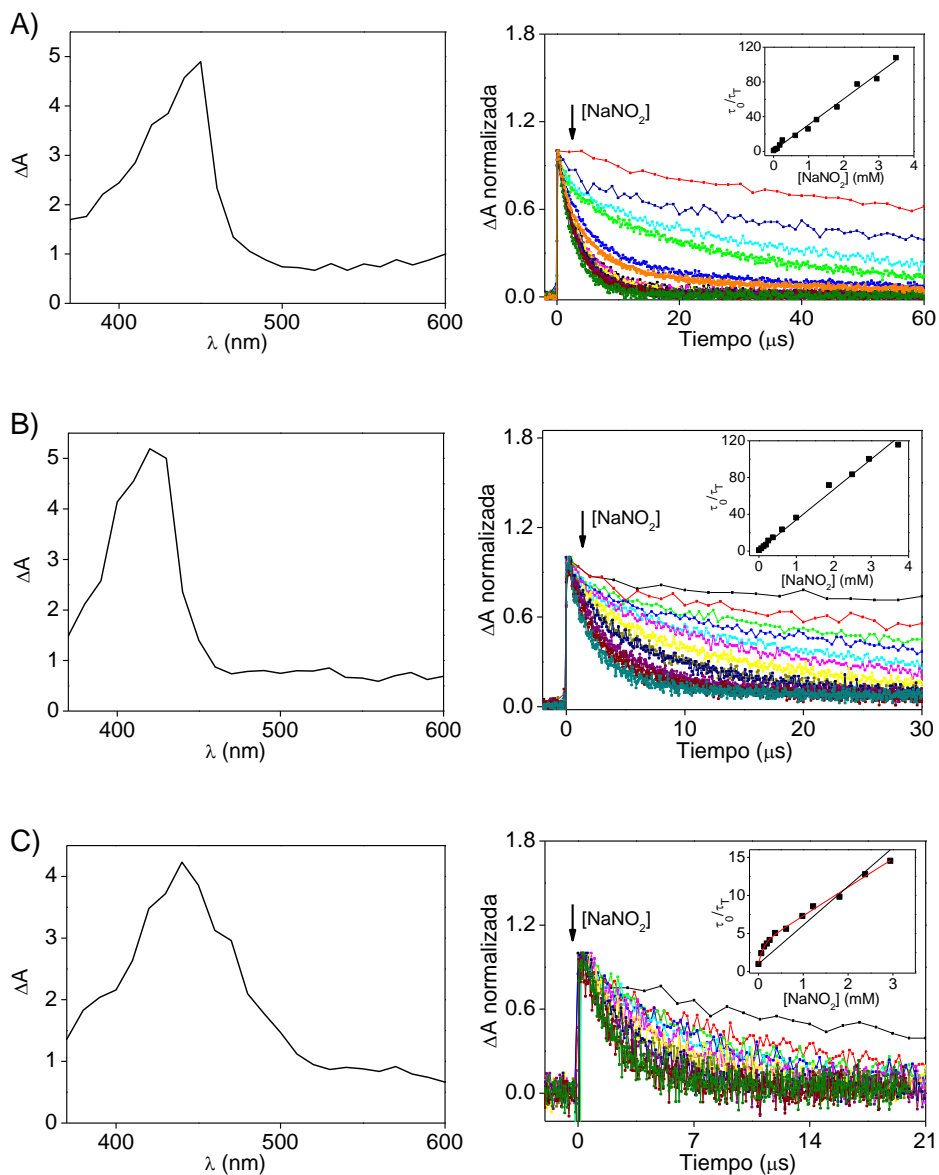


Figura 6.6. Espectros de absorción transitoria (izquierda) y cinéticas de desaparición (derecha) monitorizadas a 420 nm ($\lambda_{ex} = 266$ nm) de fármacos incorporados en MM y en disolución acuosa de NaCl 0.2 M bajo N_2 tras añadir cantidades crecientes de $NaNO_2$. A) NPXMe B) CIN y C) PPN. Las gráficas interiores son la representación Stern-Volmer.

Las cinéticas de desaparición se ajustaron a una ecuación con un término monoexponencial y su análisis de regresión permitió obtener las $k_{q,dis}$ y $k_{q,MM}$, observándose de nuevo, una diferencia entre ellas de un orden de magnitud. Estos parámetros se recopilan en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2. Constantes de desactivación del estado excitado triplete por NO_2^- .

Fármacos	$k_{q,dis} \times 10^{-9} (M^{-1}s^{-1})^a$	$k_{q,MM} \times 10^{-9} (M^{-1}s^{-1})^a$
NPXMe	1.10 ± 0.08 (NPX)	0.17 ± 0.01
CIN	3.90 ± 0.10	0.11 ± 0.01
PPN^b	1.90 ± 0.07	0.18 ± 0.01

^a Los experimentos se realizaron tres veces y los errores corresponden a las desviaciones medias. ^b A esta concentración de fármaco, el análisis por regresión de las cinéticas de desaparición se curva.

Como se puede observar en la Figura 6.6, el análisis de regresión de las cinéticas de desaparición se ajustaba a una línea recta para el NPXMe y el CIN, pero no para el PPN, lo cual se puede atribuir a la movilidad del estado excitado triplete entre MM y disolución.^{202,203} Por tanto, la $k_{q,MM}$ para el PPN se recalculó, teniendo en cuenta un equilibrio dentro - fuera de la MM, utilizando un modelo descrito previamente en la literatura (Ecuación 6.2).²⁰²

$$k_{obs} = k_0^{MM} + k_{dis} + k_q^{MM} [D] - \frac{k_{dis} k_{as} \frac{[MM]}{N}}{k_{as} \frac{[MM]}{N} + k_0 + k_q [D]} \quad \text{(Ecuación 6.2)}$$

donde k_0 y k_0^{MM} son las constantes de velocidad de desaparición, en ausencia de desactivador (D), del fármaco en disolución y en MM, respectivamente, k_q y k_q^{MM} son las constantes de desactivación del

estado excitado triplete en disolución y en MM, respectivamente, k_{as} y k_{dis} son las constantes de velocidad de asociación y disociación del fármaco en estado excitado triplete con la MM, $[MM]$ es la concentración de MM y N es el número de agregación. Así, aplicando este método, la $k_{q,MM}$ calculada para el PPN resultó ser $1.32 \pm 0.04 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ valor que resulta del mismo orden del calculado con el ajuste lineal del análisis de regresión (ver Tabla 6.2).

Los resultados obtenidos en la desactivación del estado excitado triplete están de acuerdo con los obtenidos anteriormente mediante fluorescencia, demostrando así que la metodología basada en FDL es conveniente para evaluar el grado de encapsulamiento de fármacos en el interior de MM.

6.3. Conclusiones

Los estados excitados singlete y triplete del NPXMe, CIN y PPN revelan que su encapsulación en MM es muy eficiente. Las MM han demostrado ser entidades de gran utilidad para la protección de fármacos frente a la desactivación por sales iónicas como el yoduro y el nitrito, las cuales permanecen principalmente en el agua.

Además, en presencia de MM se observa un notable aumento de los tiempos de vida de triplete de los fármacos, lo que pone de manifiesto que dentro de estas entidades moleculares existe un microambiente especial.

Así, la combinación de estas diferentes técnicas fotofísicas (fluorescencia y FDL) ha resultado ser una herramienta muy útil para evaluar la encapsulación de fármacos dentro de MM. Este enfoque puede, en principio, extenderse a otros sistemas microheterogéneos capaces de incorporar compuestos fotoactivos.

6.4. Procedimiento experimental

6.4.1.- Materiales y disolventes

La síntesis del éster metílico del NPX (NPXMe) se llevó a cabo siguiendo un procedimiento descrito en la literatura²⁰⁴ y el (*R*)-CIN fue extraído del medicamento comercial Mimpara 60 mg como se ha descrito en el Capítulo 3. El (*S*)-NPX, el clorhidrato de (*S*)-PPN, el Ch, la L (preparada a partir de yema de huevo) y la NaCl fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Así mismo, el colato sódico (NaAC) fue suministrado por Acros Organics. Todos los disolventes utilizados fueron de calidad HPLC.

6.4.2.- Preparación de micelas mixtas

A una disolución de 17.8 μmol de L y 38.8 μmol de NaAC en metanol, se añadieron 5.4 μmol de Ch y la cantidad apropiada de fármaco (0.027 μmol ó 0.27 μmol para los experimentos de fluorescencia o FDL, respectivamente) disueltos en la mínima cantidad de diclorometano. A continuación, la mezcla de disolventes orgánicos se evaporó a presión reducida durante treinta minutos a 50 °C. Para

eliminar las posibles trazas de disolvente orgánico, el recipiente de evaporación se mantuvo treinta minutos más a vacío con una bomba de aceite a temperatura ambiente. Finalmente, la rehidratación de la fina película obtenida con 1.37 mL de una disolución acuosa de NaCl 0.2 M llevó a la formación de MM con fármaco encapsulado.

6.4.3.- Medidas de fluorescencia

Las medidas de fluorescencia se realizaron a temperatura ambiente con una concentración de cromóforo de 2×10^{-5} M en condiciones aeróbicas.

Para calcular el tiempo de vida del estado excitado singlete, las cinéticas de desaparición se ajustaron a una ecuación con un término monoexponencial utilizando un método de deconvolución donde se tiene en cuenta el pulso de la lámpara.

Para todas las medidas se utilizaron celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico con capacidad para 4 mL.

6.4.4.- Medidas de fotólisis de destello láser

Las medidas de FDL se realizaron a temperatura ambiente y la absorbancia de los fármacos en disolución acuosa de NaCl 0.2 M se fijó a ca. 0.2 para la longitud de onda de excitación (266 nm). Sin embargo, en presencia de MM, la concentración de cromóforo fue de 2×10^{-4} M.

El tiempo de vida de triplete se determinó por ajuste a una ecuación con un término monoexponencial de la cinética de desaparición registrada a 420 nm.

Todas las muestras se midieron bajo condiciones anaeróbicas. Para ello, las disoluciones acuosas, las películas secas y las celdas de cuarzo se burbujearon con N₂ durante 2 horas, 1 hora y 30 minutos, respectivamente.

Para todas las medidas se utilizaron celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico con capacidad para 4 mL.

6.4.5.- Imágenes de microscopía electrónica de transmisión

Para obtener las micrografías de TEM, se depositó una alícuota de la disolución de MM durante un minuto sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono. A continuación, tras retirar el exceso de disolución para dejar una película delgada, se procedió a realizar una tinción negativa con molibdato de amonio al 1 % durante un minuto. Tras la eliminación del exceso de tinte, la película manchada resultante se dejó secar en un lugar libre de polvo.

6.4.6.- Medidas de dispersión de luz dinámica

Para determinar el tamaño de las MM con fármaco se diluyó una muestra con agua desionizada y se hicieron las mediciones de DLS a 25 °C con un ángulo de dispersión de 173 °. El diámetro hidrodinámico medio se obtuvo mediante análisis acumulativo.

Capítulo 7. Instrumentación

7.1. Instrumentación general

Los espectros de **resonancia magnética nuclear** de protón y carbono (^1H y ^{13}C -RMN) se realizaron en un espectrómetro Varian Bruker (Rheinstetten, Germany) de 300 MHz. Se utilizó como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3) y se tomó como referencia la señal residual del cloroformo no deuterado a 7.26 ppm. Los valores de desplazamiento químico (δ) son expresados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) se indican en hercios (Hz).

La determinación de la **masa exacta** se realizó en un sistema ACQUITY UPLC (Waters Corp.) con un inyector automático acondicionado a 4 °C. El volumen de inyección fue de 2 μL y el análisis se llevó a cabo usando como fase móvil acetonitrilo : agua (que contiene 0.01% de ácido fórmico) 80 : 20. El espectrómetro ACQUITY Waters™ XevoQToF (Waters Corp.) se conecta al sistema UPLC a través de una interfaz de ionización por electrospray (ESI). La fuente ESI se hizo funcionar en modo de ionización positiva con un voltaje capilar de 3.0 kV. Los flujos de gas de cono y desolvatación fueron 100 L h^{-1} y 800 L h^{-1} , respectivamente. Todos los datos se recogieron en modo Centroide y se adquirieron usando el software Masslynx™ (Waters Corp.).

Los espectros de **absorción ultravioleta-visible** (UV-Vis) se registraron en un espectrofotómetro Cary 300 UV-Vis (UV0811M209, Varian).

Las micrografías de **microscopía electrónica de transmisión** (TEM) fueron obtenidas en un microscopio Philips CM-10 trabajando con un voltaje de operación de 100 kV.

Las medidas de **dispersión de luz dinámica** (DLS) se llevaron a cabo en un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.).

7.2. Instrumentación fotoquímica

Las **fluorescencias en estado estacionario** se registraron en un espectrofluorímetro Photon Technology International (PTI) modelo LPS-220B equipado con una lámpara de Xenon de 75 W.

Las medidas de **fluorescencia en tiempo resuelto** se realizaron en un espectrómetro de tiempos de vida de PTI modelo TM-2/2003 equipado con una lámpara H₂/N₂ (50/50, duración del pulso de 1.8 ns) y un detector estroboscópico.

Los espectros de **fosforescencia** se llevaron a cabo en un espectrómetro de PTI modelo TM-2/2003 provisto con una lámpara de Xe pulsada. Dicho aparato funcionó en modo de resolución temporal con un tiempo de retardo de 0.5 ms.

Para los experimentos de **fotólisis de destello láser** (FDL) se utilizaron dos equipos diferentes: un láser pulsado Nd-YAG (L52137V LOTIS TII) con duración de pulso de 10 ns y energía 10 - 15 mJ/pulso para la excitación a 266 nm o un láser de excímero de XeCl (LEXTRA 50 Lambda Physik Laser Technik) con duración ca. 17 ns y energía 30

mJ/pulso para la excitación a 308 nm. En ambos casos, se empleó una lámpara de Xenón Oriel Lo255 (Statford, CT) como fuente de luz para el análisis de las especies transitorias. El sistema de FDL consiste en un láser pulsado, una lámpara de Xe, un monocromador Oriel 77200, un sistema fotomultiplicador Oriel (PMT) formado por un tubo lateral 77348 PMT, una carcasa 70680 PMT, una fuente de potencia 70705 PMT y un osciloscopio Tektronik TDS-640A. La señal fue transferida a un ordenador personal donde los datos se trataron mediante el programa Onda. Las medidas de fosforescencia de **oxígeno singlete** se realizaron en el láser Nd-YAG (L52137V LOTIS TII) anteriormente descrito a longitud de onda de excitación de 266 nm. Para ello se empleó un detector Hamamatsu en el infrarrojo cercano operando a 588 V acoplado a un monocromador de rejilla controlado por ordenador.

Bibliografía

Bibliografía

- (1) Rehm, D.; Weller, A. *Isr. J. Chem.* **1970**, *8*, 259.
- (2) Weller, A. *Z. Phys. Chem.* **1982**, *133*, 93.
- (3) Speiser, S. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1953.
- (4) Birks, J. B. *Photophysics of Aromatic Molecules*; Wiley: New York, 1970.
- (5) Birks, J. B.; Christophorou, L. G. *Nature* **1962**, *194*, 442.
- (6) Chandross, E. A.; Dempster, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 3586.
- (7) Chandross, E. A.; Ferguson, J. *J. Chem. Phys.* **1966**, *45*, 397.
- (8) Förster, T.; Kasper, K.Z. *Electrochem.* **1955**, *59*, 976.
- (9) Das, P.; Chakrabarty, A.; Mallick, A.; Chattopadhyay, N. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 11169.
- (10) Guharay, J.; Sengupta, B.; Sengupta, P. K. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2001**, *43*, 75.
- (11) Mallick, A.; Haldar, B.; Maiti, S.; Bera, S. C.; Chattopadhyay, N. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 14675.
- (12) Mallick, A.; Purkayastha, P.; Chattopadhyay, N. *J. Photochem. Photobiol. C* **2007**, *8*, 109.
- (13) Sengupta, B.; Sengupta, P. K. *Biopolymers* **2003**, *72*, 427.
- (14) Barrett, G. C.; Davies, J. S. *Amino Acids, Peptides and Protein*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2004; Vol. 34.
- (15) Petsko, G.; Ringe, D. *Protein Structure and Function*; Blackwell Publishing: Oxford, 2003.
- (16) Branden, C.; Tooze, J. *Introduction to Protein Structure*; Taylor and Francis: New York, 1999.
- (17) Peters, T. Jr. *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 161.
- (18) Wong, C. H. *Science* **1989**, *244*, 1145.

-
- (19) Yamada, H.; Shimizu, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 622.
- (20) Chapman, M. J.; Forgez, P. *Reprod. Nutr. Dev.* **1985**, *25*, 217.
- (21) Peters, T. *All About Albumin; Biochemistry, Genetics and Medical Applications*; Academic Press: New York, 1995.
- (22) Israili, Z. H.; Dayton, P. G. *Drug Metab. Rev.* **2001**, *33*, 161.
- (23) Vaya, I.; Bueno, C. J.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1015.
- (24) Vaya, I.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 2694.
- (25) Dockal, M.; Carter, D. C.; Ruker, F. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 29303.
- (26) Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K. *Protein Eng.* **1999**, *12*, 439.
- (27) Kragh-Hansen, U.; Chuang, V. T. G.; Otagiri, M. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 695.
- (28) Ewaskiewicz, J. I.; Devlin, T. M.; Ch'ih, J. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *179*, 1095.
- (29) Drmanovic, Z.; Voyatzi, S.; Kouretas, D.; Sahpazidou, D.; Papageorgiou, A.; Antonoglou, O. *Anticancer Res.* **1999**, *19*, 4113.
- (30) Ikeda, T. *Proceedings of the International Symposium on Serum Albumin and α 1-Acid Glycoprotein*; ed. by Otagiri, M., Sugiyama, Y., Testa, B., Tillement, J. P.: Kumamoto, Japan, 2001.
- (31) Dubois-Presle, N.; Lopicque, F.; Maurice, M.-H.; Fournel-Gigleux, S.; Magdalou, J.; Abiteboul, M.; Siest, G.; Netter, P. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *47*, 647.
- (32) Georges, H.; Presle, N.; Buronfosse, T.; Fournel-Gigleux, S.; Netter, P.; Magdalou, J.; Lopicque, F. *Chirality* **2000**, *12*, 53.
- (33) He, X. M.; Carter, D. C. *Nature* **1992**, *358*, 209.
-

-
- (34) Carter, D. C.; Ho, J. X. *Adv. Protein Chem.* **1994**, *45*, 153.
- (35) Curry, S.; Mandelkow, H.; Brick, P.; Franks, N. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 827.
- (36) Ferrer, M. L.; Duchowicz, R.; Carrasco, B.; Garcia, d. I. T. J.; Acuna, A. U. *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2422.
- (37) Hirayama, K.; Akashi, S.; Furuya, M.; Fukuhara, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *173*, 639.
- (38) Keire, D. A.; Mariappan, S. V. S.; Peng, J.; Rabenstein, D. L. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46*, 1059.
- (39) Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N. *Mol. Pharmacol.* **1976**, *12*, 1052.
- (40) Lopicque, F.; Muller, N.; Payan, E.; Dubois, N.; Netter, P. *Clin. Pharmacokinet.* **1993**, *25*, 115.
- (41) Schmid, K. *In The Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control*; 2nd ed.; Academic Press: New York, 1975; Vol. I.
- (42) Lentner, C. *Documenta Geigy Scientific Tables. Physical Chemistry. Blood, Somatometric Data*; 8^a ed.; Ciba Geigy Corporation: West Caldwell, NJ, 1984.
- (43) Carpentier, V.; Midoux, P.; Monsigny, M.; Roche, A. C. *Biol. Cell* **1993**, *77*, 187.
- (44) Jakab, L.; Kalabay, L. *Acta Microbiol. Immunol. Hung* **1998**, *45*, 409.
- (45) Rolan, P. E.; Muirhead, M.; Clarkson, A. R. *Nephron.* **1986**, *42*, 345.
- (46) Weisman, S.; Goldsmith, B.; Winzler, R.; Lepper, M. H. *J. Lab. Clin. Med.* **1961**, *57*, 7.
- (47) Haraldsson, B.; Rippe, B. *Acta Physiol. Scand.* **1987**, *129*, 127.
- (48) Frantz, M.; Jung, M.-L.; Ribereau-Gayon, G.; Anton, R. *Arzneim.-Forsch.* **2000**, *50*, 471.
-

-
- (49) Moore, D. F.; Rosenfeld, M. R.; Gribbon, P. M.; Winlove, C. P.; Tsai, C. M. *Inflammation* **1997**, *21*, 69.
- (50) Athamna, A.; Kramer, M. R.; Kahane, I. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **1996**, *15*, 135.
- (51) Superti, F.; Marziano, M. L.; Tinari, A.; Donelli, G. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **1993**, *16*, 55.
- (52) Su, S.-J.; Yang, B.-C.; Wang, Y.-S.; Yeh, T.-M. *Immunopharmacology* **1999**, *41*, 21.
- (53) Van, M. w.; Libert, C.; Fiers, W.; Brouckaert, P. *J. Immunol.* **1997**, *159*, 3555.
- (54) Libert, C. *Verh. K. Acad. Geneesk. Belg.* **1997**, *59*, 515.
- (55) Cheresch, D. A.; Haynes, D. H.; Paul, R. D.; Lopez, D. M.; Silverman, M. A.; Distasio, J. A. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **1982**, *23*.
- (56) Cheresch, D. A.; Haynes, D. H.; Distasio, J. A. *Immunology* **1984**, *51*, 541.
- (57) Schmid, K.; Nimberg, R. B.; Kimura, A.; Yamaguchi, H.; Binette, J. P. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *492*, 291.
- (58) Schmid, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 60.
- (59) Hochepped, T.; Berger, F. G.; Baumann, H.; Libert, C. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2003**, *14*, 25.
- (60) Aubert, J. P.; Loucheuxlefebvre, M. H. *Arch. Biochem. Biophys.* **1976**, *175*, 400.
- (61) Friedman, M. L.; Wermeling, J. R.; Halsall, H. B. *Biochem. J.* **1986**, *236*, 149.
- (62) Cecilian, F.; Pocacqua, V.; Lecchi, C.; Fortin, R.; Rebutti, R.; Avallone, G.; Bronzo, V.; Cheli, F.; Sartorelli, P. *J. Dairy Res.* **2007**, *74*, 374.
-

-
- (63) Tamura, K.; Yatsu, T.; Itoh, H.; Motoi, Y. *Jpn. J. Vet. Sci.* **1989**, *51*, 987.
- (64) Kopecky, V.; Ettrich, R.; Hofbauerova, K.; Baumruk, V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *300*, 41.
- (65) Rojo-Dominguez, A.; Hernandez-Arana, A. *Protein Seq. Data Anal.* **1993**, *5*, 349.
- (66) Kopitar, V. Z. W., H. *Arzneim. Forsch. / Drug. Res.* **1971**, *21*, 859.
- (67) Schmid, K.; Kaufmann, H.; Isemura, S.; Bauer, F.; Emura, J.; Motoyama, T.; Ishiguro, M.; Nanno, S. *Biochemistry* **1973**, *12*, 2711.
- (68) Albani, F.; Riva, R.; Contin, M.; Baruzzi, A. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1984**, *18*, 244.
- (69) Grimaldi, B.; Hamberger, C.; Tremblay, D.; Barre, J.; Tillement, J. P. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1989**, *300*, 445.
- (70) Schley, J.; Mueller-Oerlinghausen, B. *Pharmacopsychiatria* **1983**, *16*, 82.
- (71) Israili, Z. H.; El-Attar, H. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1983**, *33*, 255.
- (72) Walker, J. L.; Clarke, C. R.; Hague, C. M.; Bourne, D. W. A.; Lessley, B. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 2392.
- (73) Matsumoto, K.; Sukimoto, K.; Nishi, K.; Maruyama, T.; Suenaga, A.; Otagiri, M. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2002**, *17*, 300.
- (74) Kragh-Hansen, U. *Dan. Med. Bull.* **1990**, *37*, 57.
- (75) Menke, G.; Worner, W.; Kratzer, W.; Rietbrock, N. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1989**, *339*, 42.
- (76) Goolkasian, D. L.; Slaughter, R. L.; Edwards, D. J.; Lalka, D. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1983**, *25*, 413.
- (77) Curtin, N. J.; Newell, D. R.; Harris, A. L. *Biochem. Pharmacol.* **1989**, *38*, 3281.
-

-
- (78) Rahman, M. H.; Maruyama, T.; Okada, T.; Imai, T.; Otagiri, M. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46*, 1733.
- (79) Rahman, M. M.; Rahman, M. H.; Rahman, N. N. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2005**, *18*, 43.
- (80) Lichtenberg, D.; Ragimova, S.; Bor, A.; Almog, S.; Vinkler, C.; Kalina, M.; Peled, Y.; Halpern, Z. *Biophys. J.* **1988**, *54*, 1013.
- (81) Porter, C. J. H.; Trevaskis, N. L.; Charman, W. N. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 231.
- (82) Wang, D. Q. H.; Cohen, D. E.; Carey, M. C. *J. Lip. Res.* **2009**, S406.
- (83) Cabral, D. J.; Small, D. M. *Physical chemistry of bile. Handbook of physiology: The gastrointestinal System III, section 6*; American Physiological Society, Waverly Press: Baltimore, 1989.
- (84) Carey, M. C. *Lipid solubilization in bile*; Klumer Academic: Dordrecht, The Netherlands, 1988.
- (85) Wiedmann, T. S.; Kamel, L. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 1743.
- (86) Ie, M. M.; Champeil, P.; Moller, J. V. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2000**, *1508*, 86.
- (87) Lichtenberg, D.; Robson, R. J.; Dennis, E. A. *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.* **1983**, *737*, 285.
- (88) Cohen, D. E.; Angelico, M.; Carey, M. C. *J. Lipid Res.* **1990**, *31*, 55.
- (89) Luk, A. S.; Kaler, E. W.; Lee, S. P. *Biochemistry* **1997**, *36*, 5633.
- (90) de la Maza, A.; Manich, A. M.; Parra, J. L. *J. Microsc-Oxford* **1997**, *186*, 75.
- (91) Hildebrand, A.; Neubert, R.; Garidel, P.; Blume, A. *Langmuir* **2002**, *18*, 2836.
- (92) Cohen, D. E.; Thurston, G. M.; Chamberlin, R. A.; Benedek, G. B.; Carey, M. C. *Biochemistry* **1998**, *37*, 14798.
-

-
- (93) Sun, C. Q.; Sano, Y.; Kashiwagi, H.; Ueno, M. *Colloid Polym. Sci.* **2002**, *280*, 900.
- (94) Muller, K. *Biochemistry* **1981**, *20*, 404.
- (95) Yuet, P. K.; Blankschtein, D.; Donovan, J. M. *Hepatology* **1996**, *23*, 896.
- (96) Schwarz, M. A.; Raith, K.; Ruettinger, H. H.; Dongowski, G.; Neubert, R. H. H. *J. Chromatogr. A* **1997**, *781*, 377.
- (97) Stark, R. E.; Roberts, M. F. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1984**, *770*, 115.
- (98) Dressman, J. B.; Vertzoni, M.; Goumas, K.; Reppas, C. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, *59*, 591.
- (99) Armstrong, N. A.; James, K. C. *Int. J. Pharm.* **1980**, *6*, 195.
- (100) Carrigan, P. J.; Bates, T. R. *J. Pharm. Sci.* **1973**, *62*, 1476.
- (101) Humberstone, A. J.; Charman, W. N. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *25*, 103.
- (102) Palin, K. J.; Wilson, C. G. *J. Pharm. Pharmacol.* **1984**, *36*, 641.
- (103) Palin, K. J.; Wilson, C. G.; Davis, S. S.; Phillips, A. J. *J. Pharm. Pharmacol.* **1982**, *34*, 707.
- (104) Stella, V.; Haslam, J.; Yata, N.; Okada, H.; Lindenbaum, S.; Higuchi, T. *J. Pharm. Sci.* **1978**, *67*, 1375.
- (105) Porter, C. J. H.; Charman, W. N. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *50*, 127.
- (106) Hammad, M. A.; Muller, B. W. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1998**, *46*, 361.
- (107) Hammad, M. A.; Muller, B. W. *Eur. J. Pharm. Sci.* **1998**, *7*, 49.
- (108) Hammad, M. A.; Muller, B. W. *Int. J. Pharm.* **1998**, *169*, 55.
- (109) Alkanonyuksel, H.; Ramakrishnan, S.; Chai, H. B.; Pezzuto, J. M. *Pharm. Res.* **1994**, *11*, 206.
- (110) Hammad, M. A.; Muller, B. W. *Pharmazie* **1998**, *53*, 790.
-

-
- (111) Sznitowska, M.; Klunder, M.; Placzek, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 70.
- (112) Rosen, M. J. *Surfactants and interfacial phenomena*; 2 ed.; John Wiley & Sons: New York, 1989.
- (113) Kumar, G. N.; Sproul, C.; Poppe, L.; Turner, S.; Gohdes, M.; Ghoborah, H.; Padhi, D.; Roskos, L. *Drug Metab. Dispos.* **2004**, *32*, 1491.
- (114) Peck, A. *Kidney* **2009**, *18*, 175.
- (115) Nagano, N. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *109*, 339.
- (116) Apostolou, T.; Damianou, L.; Kotsiev, V.; Drakopoulos, S.; Hadjiconstantinou, V. *Clin. Nephrol.* **2006**, *65*, 374.
- (117) Kawata, T.; Imanishi, Y.; Kobayashi, K.; Onoda, N.; Okuno, S.; Takemoto, Y.; Komo, T.; Tahara, H.; Wada, M.; Nagano, N.; Ishimura, E.; Miki, T.; Ishikawa, T.; Inaba, M.; Nishizawa, Y. *J. Bone Miner. Metab.* **2006**, *24*, 300.
- (118) Kruse, A. E.; Eisenberger, U.; Frey, F. J.; Mohaupt, M. G. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2007**, *22*, 2362.
- (119) Lindberg, J. S.; Culleton, B.; Wong, G.; Borah, M. F.; Clark, R. V.; Shapiro, W. B.; Roger, S. D.; Husserl, F. E.; Klassen, P. S.; Guo, M. D.; Albizem, M. B.; Coburn, J. W. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2005**, *16*, 800.
- (120) Rodgers, S. E.; Perrier, N. D. *Curr. Opin. Oncol.* **2006**, *18*, 16.
- (121) Silverberg, S. J.; Rubin, M. R.; Faiman, C.; Peacock, M.; Shoback, D. M.; Smallridge, R. C.; Schwanauer, L. E.; Olson, K. A.; Klassen, P.; Bilezikian, J. P. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2007**, *92*, 3803.
- (122) Szmuilowicz, E. D.; Utiger, R. D. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **2006**, *2*, 291.
- (123) Abad, S.; Pischel, U.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 2711.
-

-
- (124) Jimenez, M. C.; Pischel, U.; Miranda, M. A. *J. Photochem. Photobiol., C* **2007**, *8*, 128.
- (125) Sortino, S.; Petralia, S.; Bosca, F.; Miranda, M. A. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 136.
- (126) Bosca, F.; Canudas, N.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. *Photochem. Photobiol.* **2000**, *71*, 173.
- (127) De, L. P. D.; Marti, C.; Nonell, S.; Martinez, L. A.; Miranda, M. A. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 828.
- (128) Pierlot, C.; Hajjam, S.; Barthelemy, C.; Aubry, J. M. *J. Photochem. Photobiol., B* **1996**, *36*, 31.
- (129) Beaudry, F.; Coutu, M.; Brown, N. K. *Biomed. Chromatogr.* **1999**, *13*, 401.
- (130) Frostell-Karlsson, A.; Remaeus, A.; Roos, H.; Andersson, K.; Borg, P.; Haemaelaenen, M.; Karlsson, R. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1986.
- (131) Lhiaubet-Vallet, V.; Bosca, F.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 423.
- (132) Montanaro, S.; Lhiaubet-Vallet, V.; Jimenez, M. C.; Blanca, M.; Miranda, M. A. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1196.
- (133) Moser, J.; Bosca, F.; Lovell, W. W.; Castell, J. V.; Miranda, M. A.; Hye, A. *J. Photochem. Photobiol., B* **2000**, *58*, 13.
- (134) Vaya, I.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 9363.
- (135) Vaya, I.; Perez-Ruiz, R.; Lhiaubet-Vallet, V.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *486*, 147.
- (136) Pina, F.; Lima, J. C.; Lodeiro, C.; Seixas, d. M. J.; Diaz, P.; Albelda, M. T.; Garcia-España, E. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 8207.
- (137) Chow, Y. L.; Danen, W. C.; Nelsen, S. F.; Rosenblatt, D. H. *Chem. Rev.* **1978**, *78*, 243.
-

-
- (138) Murov, S. L. C., I.; Hug, G. L. *Handbook of Photochemistry*; 2nd ed.; Marcel Dekker: New York, 1993.
- (139) Kristiansen, M.; Scurlock, R. D.; Iu, K. K.; Ogilby, P. R. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 5190.
- (140) Wilkinson, F.; McGarvey, D. J.; Olea, A. F. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 3762.
- (141) Iu, K. K.; Ogilby, P. R. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 1611.
- (142) www.amgen.ca/Sensipar_PM.pdf.
- (143) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 3rd ed.; Springer Science + Business Media, LLC: New York, 2006.
- (144) Wei, Y. L.; Dong, C.; Liu, D. S.; Shuang, S. M.; Huie, C. W. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 761.
- (145) Jimenez, M. C.; Miranda, M. A.; Vaya, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10134.
- (146) Lhiaubet-Vallet, V.; Sarabia, Z.; Bosca, F.; Miranda, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9538.
- (147) Vaya, I.; Bueno, C. J.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *Chem.-Eur. J.* **2008**, *14*, 11284.
- (148) Bueno, C. J.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6861.
- (149) Perez-Ruiz, R.; Bueno, C. J.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 829.
- (150) Banerjee, T.; Singh, S. K.; Kishore, N. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 24147.
- (151) Gonzalez-Bejar, M.; Alarcon, E.; Poblete, H.; Scaiano, J. C.; Perez-Prieto, J. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2255.
- (152) Honore, B.; Brodersen, R. *Mol. Pharmacol.* **1984**, *25*, 137.
- (153) Kober, A.; Sjöholm, I. *Mol. Pharmacol.* **1980**, *18*, 421.
-

-
- (154) Lejon, S.; Cramer, J. F.; Nordberg, P. *Acta Crystallogr. F-Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2008**, *64*, 64.
- (155) Sjöholm, I.; Ekman, B.; Kober, A.; Ljungstedtpahlman, I.; Seiving, B.; Sjödin, T. *Mol. Pharmacol.* **1979**, *16*, 767.
- (156) Vera-Avila, L. E.; Garcia-Salgado, E.; de Llasera, M. P. G.; Pena-Alvarez, A. *Anal. Biochem.* **2008**, *373*, 272.
- (157) Jia, Z. J.; Ramstad, T.; Zhong, M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *30*, 405.
- (158) Mallik, R.; Xuan, H.; Guiochon, G.; Hage, D. S. *Anal. Biochem.* **2008**, *376*, 154.
- (159) Nuin, E.; Andreu, I.; Torres, M. J.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 1158.
- (160) Bijukumar, G.; Maloyesh, B.; Bhaskar, B. S.; Rajendra, A. *Synth. Commun.* **2008**, *38*, 1512.
- (161) Fehske, K. J.; Müller, K. J.; Schläfer, U.; Wollert, U. *Drug Protein Binding* **1981**, *2*, 5.
- (162) Itoh, T.; Saura, Y.; Tsuda, Y.; Yamada, H. *Chirality* **1997**, *9*, 643.
- (163) *Drug-Drug Interactions (Drugs and the Pharmaceutical Science, Vol. 178)*; 2 nd, Rodrigues, A. D. ed.; Informa Healthcare USA, Inc., 2008.
- (164) Aszalos, A. *Drug Discov. Today* **2007**, *12*, 838.
- (165) Aszalos, A. *Drug Discov. Today* **2007**, *12*, 833.
- (166) Wang, B. *Drug-Drug Interactions in Pharmaceutical Development* Li, A. P. ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey, 2008.
- (167) Dresser, G. K.; Bailey, D. G. *Can. J. Clin. Pharmacol.* **2002**, *9*, 191.
- (168) Ito, K.; Iwatsubo, T.; Kanamitsu, S.; Ueda, K.; Suzuki, H.; Sugiyama, Y. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 387.
-

-
- (169) Malone, D. C.; Abarca, J.; Hansten, P. D.; Grizzle, A. J.; Armstrong, E. P.; Van, B. R. C.; Duncan-Edgar, B. S.; Solomon, S. L.; Lipton, R. B. *J. Am. Pharm. Assoc.* **2004**, *44*, 142.
- (170) www.ema.europa.eu.
- (171) www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm.
- (172) Breedveld, P.; Zelcer, N.; Pluim, D.; Soenmezer, O.; Tibben, M. M.; Beijnen, J. H.; Schinkel, A. H.; van, T. O.; Borst, P.; Schellens, J. H. M. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 5804.
- (173) Hansten, P. D.; Horn, J. R.; Hazlet, T. K. *J. Am. Pharm. Assoc.* **2001**, *41*, 161.
- (174) Shitara, Y.; Sato, H.; Sugiyama, Y. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, *45*, 689.
- (175) Ayrton, A.; Morgan, P. *Xenobiotica* **2001**, *31*, 469.
- (176) Isoherranen, N.; Hachad, H.; Yeung, C. K.; Levy, R. H. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 294.
- (177) Jimenez, M. C.; Miranda, M. A.; Tormos, R.; Vaya, I. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 1038.
- (178) Perez-Ruiz, R.; Alonso, R.; Nuin, E.; Andreu, I.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 4460.
- (179) Nishi, K.; Sakai, N.; Komine, Y.; Maruyama, T.; Halsall, H. B.; Otagiri, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1601*, 185.
- (180) Block, G. A.; Zaun, D.; Smits, G.; Persky, M.; Brillhart, S.; Nieman, K.; Liu, J.; St, P. W. L. *Kidney Int.* **2010**, *78*, 578.
- (181) Lister, B. J.; Poland, M.; DeLapp, R. E. *Am. J. Med.* **1993**, *95*, 2.
- (182) Martinez, L. J.; Scaiano, J. C. *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 646.

-
- (183) Nishi, K.; Ono, T.; Nakamura, T.; Fukunaga, N.; Izumi, M.; Watanabe, H.; Suenaga, A.; Maruyama, T.; Yamagata, Y.; Curry, S.; Otagiri, M. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 14427.
- (184) Gale, J. D. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1997**, *93*, 629.
- (185) Gale, J. D.; Rohl, A. L. *Mol. Simul.* **2003**, *29*, 291.
- (186) *Computer Simulation of Solids*, Eds. Catlow, C. R. A.; Mackrodt, W. C.; Lecture Notes in Physics, Springer, Berlin, 1982; Vol. 166.
- (187) Catlow, C. R. A.; Cormack, A. N. *Int. Rev. Phys. Chem.* **1987**, *6*, 227.
- (188) Sastre, G. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 1052.
- (189) Hanwell, M. D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G. R. *J. Cheminform.* **2012**, *4*, 17.
- (190) Stewart, J. J. P. *J. Mol. Mod.* **2013**, *1*, 19.
- (191) Stewart, J. J. P. M., James J. P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, <http://openmopac.net> 2012.
- (192) Garidel, P. L., J. Mixed Vesicles and Mixed Micelles: Formation, Thermodynamic Stability, and Pharmaceutical Aspects. In *Liposome Technology*; 3rd ed., 2006; Vol. 1, pp 209-239.
- (193) Rangel-Yagui, C. O.; Pessoa, A.; Tavares, L. C. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2005**, *8*, 147.
- (194) Hendradi, E.; Obata, Y.; Isowa, K.; Nagai, T.; Takayama, K. *Biol. Pharm. Bull.* **2003**, *26*, 1739.
- (195) Parsaee, S.; Sarbolouki, M. N.; Parnianpour, M. *Int. J. Pharm.* **2002**, *241*, 185.
- (196) Song, X.; Jiang, Y.; Ren, C.; Sun, X.; Zhang, Q.; Gong, T.; Zhang, Z. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 3689.
- (197) Yu, J.-n.; Zhu, Y.; Wang, L.; Peng, M.; Tong, S.-s.; Cao, X.; Qiu, H.; Xu, X.-m. *Acta Pharmacol. Sin.* **2010**, *31*, 759.
-

- (198) Ren, C.; Gong, T.; Sun, X.; Zhang, Z.; Zhang, Y. *Pharmazie* **2011**, *66*, 875.
- (199) Mrestani, Y.; Behbood, L.; Hartl, A.; Neubert, R. H. H. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, *74*, 219.
- (200) Gomez-Mendoza, M.; Nuin, E.; Andreu, I.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 10213.
- (201) Nuin, E.; Gomez-Mendoza, M.; Andreu, I.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 298.
- (202) Bohne, C. *Langmuir* **2006**, *22*, 9100.
- (203) Rinco, O.; Nolet, M. C.; Ovans, R.; Bohne, C. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, *2*, 1140.
- (204) Tsai, S. W.; Huang, C. M. *Enzyme Microb. Tech.* **1999**, *25*, 682.

Conclusiones

Conclusiones

De la presente tesis doctoral, que se enmarca dentro de la fotofísica y la fotoquímica de fármacos que poseen un cromóforo de tipo naftaleno (NP) en medios microheterogéneos, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1.- Sobre el cinacalcet (CIN) y su interacción con la albúmina sérica humana (ASH):

1.1- El estado excitado singlete del CIN se desactiva intramolecularmente por el grupo amino, generando un excíplejo. En presencia de ácido, este grupo se encuentra protonado y no se observa dicha desactivación.

1.2.- Desde el punto de vista biológico, tanto en medio acuoso como orgánico, la propiedad fotofísica más importante del CIN es la formación del estado excitado triplete.

1.3.- En los complejos con ASH el tiempo de vida de triplete del CIN es notablemente más largo que en disolución.

1.4.- La constante de velocidad de desactivación del triplete de CIN por O₂ es dos órdenes de magnitud menor dentro de la ASH que en disolución. Por tanto, el microambiente proporcionado por la ASH protege al CIN del ataque por oxígeno, evitando así los posibles efectos fototóxicos causados por la formación de oxígeno singlete (¹O₂) y aumentando la fotoseguridad del fármaco.

2.- Sobre la distribución de fármacos en sistemas binarios conteniendo proteínas transportadoras albúmina sérica (AS) y α -glicoproteína ácida (AAG) simultáneamente en el medio:

2.1.- La técnica de FDL, usando la absorción triplete-triplete del cromóforo NP como sonda, permite determinar "*in situ*" el grado de unión de los fármacos a cada proteína.

2.2.- El naproxeno (NPX) se une preferentemente a las AS, el propranolol (PPN) muestra una mayor afinidad por las AAG y el CIN se une de manera eficiente a ambas proteínas transportadoras.

2.3.- No se observa una estereodiferenciación significativa en el proceso de unión de los diferentes sustratos a AS/AAG en ninguno de los tres casos.

3.- Sobre la interacción entre dos fármacos presentes a la vez en el mismo sitio de unión de la AAG (humana y bovina):

3.1.- El primer estado excitado triplete de la nabumetona (NAB) y del PPN es altamente sensible a la interacción con el CIN, que se detecta mediante una variación considerable del tiempo de vida.

3.2.- La desactivación del triplete del PPN o de la NAB en presencia de CIN ocurre por transferencia de energía triplete-triplete (TETT) dentro del mismo sitio de unión de AAG.

3.3.- Cálculos teóricos realizados con el par PPN/CIN dentro de la AAGH confirman que la TTET es posible debido a la geometría del complejo, al solapamiento entre los orbitales moleculares implicados y a la diferencia de energía entre los estados excitados.

4.- Sobre la encapsulación de fármacos dentro de micelas mixtas (MM):

4.1.- Los estados excitados triplete y singlete constituyen sondas adecuadas para determinar la encapsulación de los fármacos CIN, PPN, NPX y del pro-fármaco NPXMe en el interior de MM.

4.2.- La desactivación de la fluorescencia (por yoduro) y del estado excitado triplete (por nitrito), tanto en disolución como en MM, evidencian que el PPN, el CIN y el NPXMe se incorporan eficientemente dentro de MM a diferencia del (S)-NPX. Estos resultados están de acuerdo con la menor hidrofobicidad del NPX, el cual posee un ácido carboxílico libre en su estructura química.

Resúmenes

Resumen en castellano

Los fármacos son utilizados con fines terapéuticos, diagnósticos o preventivos y su transporte hacia la región intracelular ocurre a través de interfases. Por tanto, la importancia de los medios microheterogéneos radica en que permiten modelizar el comportamiento de los fármacos en espacios restringidos biomiméticos. El número de técnicas empleadas para estudiar dicho comportamiento es muy amplio y variado, aunque sus principales inconvenientes son la falta de sensibilidad y reproducibilidad o un procedimiento experimental complicado. Recientemente se ha utilizado la técnica de fotólisis de destello láser (FDL) para el estudio de sistemas ligando-biomolécula y se ha demostrado que el estado excitado triplete es muy sensible al medio y, por tanto, puede ser utilizado como sonda en complejos fármaco-proteína.

Con estos antecedentes, se ha desarrollado una nueva metodología, basada en el uso de las técnicas de FDL y de fluorescencia, para obtener información relevante sobre el tipo de interacciones supramoleculares que tienen lugar entre fármacos y distintas entidades que actúan como anfitriones. Así, se han estudiado las especies transitorias generadas a partir de sustratos seleccionados, utilizándose sus propiedades como parámetros cuantitativos dependientes de las características del medio.

En primer lugar, se han estudiado las propiedades fotofísicas y fotoquímicas del nuevo agente calcimimético (*R*)-cinacalcet (CIN). Se han identificado los principales procesos de desactivación de sus estados excitados y se han determinado sus tiempos de vida, así como

los rendimientos cuánticos de los procesos fotofísicos implicados. Específicamente, el estado excitado triplete del CIN es altamente sensible al medio y su tiempo de vida en presencia de albúmina sérica humana (ASH) es considerablemente más largo que en disolución. Además, la constante de velocidad de desactivación por oxígeno en el microambiente proteico es dos órdenes de magnitud menor que en disolución. Así, se ha observado que la proteína proporciona al (*R*)-CIN un microambiente que lo protege del ataque por oxígeno, impidiendo los efectos fototóxicos causados por la formación de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y aumentando en consecuencia la fotoseguridad del fármaco.

Una vez caracterizados los estados excitados singlete y triplete de menor energía del (*R*)-CIN, se ha profundizado en el conocimiento de las interacciones fármaco-proteína, extendiendo el estudio a otros fármacos que también poseen cromóforo naftaleno (NP) como son el (*S*)-naproxeno ((*S*)-NPX) y el (*S*)-propranolol ((*S*)-PPN). Con el fin de detectar una posible estereodiferenciación, la investigación también se ha llevado a cabo con sus correspondientes enantiómeros. Para ello, se ha sintetizado el (*S*)-CIN (no comercial) a partir del ácido 3-(trifluorometil)cinámico. Posteriormente, se han estudiado las interacciones entre los distintos sustratos y sistemas binarios conteniendo albúmina sérica (AS) y α -glicoproteína ácida (AAG) presentes simultáneamente, tanto humanas como bovinas. Analizando las cinéticas de desaparición del estado excitado triplete obtenidas mediante FDL se deduce que la principal proteína transportadora del NPX es la AS, mientras que para el PPN es la AAG; el CIN constituye un caso intermedio, ya que es transportado por ambas proteínas. No se ha encontrado una estereodiferenciación significativa en ninguno de los derivados del NP.

Otro campo de aplicación interesante de la FDL ha sido el estudio de la interacción fármaco-fármaco en el mismo sitio de unión de una proteína transportadora (AAG humana y bovina). En el sistema PPN/CIN/AAG se ha observado que el primer estado excitado triplete del PPN interacciona eficientemente con el CIN, lo que se traduce en una disminución considerable de su tiempo de vida. Esta desactivación puede explicarse a través de una transferencia de energía triplete-triplete (TETT) dentro del único sitio de unión disponible en la AAG, lo que está de acuerdo con los valores relativos de energía de triplete determinados para los dos fármacos. Además, los cálculos teóricos realizados para el par PPN/CIN, han confirmado que la disposición de los dos cromóforos en el interior de la proteína es compatible con una TETT. Resultados similares se han obtenido para la nabumetona (NAB) en el sistema NAB/CIN/AAG.

Por último, se han empleado los estados excitados como sondas para investigar la encapsulación de los fármacos (*R*)-CIN, (*S*)-PPN y (*S*)-NPX, así como del pro-fármaco (*S*)-NPXMe (éster metílico del (*S*)-NPX), en el interior de micelas mixtas (MM). Para ello, se han llevado a cabo experimentos de desactivación de la fluorescencia por yoduro y del estado excitado triplete por nitrito, tanto en disolución como en MM. La disminución de un orden de magnitud de las constantes de desactivación del PPN, del CIN y del NPXMe en MM se asocia con una eficiente encapsulación, mientras que no ocurre lo mismo en el caso del NPX. Esto puede ser debido a la diferente hidrofobicidad de los sustratos, ya que el NPX posee un ácido carboxílico libre en su estructura química y exhibe una mayor solubilidad en medio acuoso.

Resum en valencià

Els fàrmacs són utilitzats amb finalitats terapèutiques, diagnòstiques o preventives i el seu transport cap a la regió intracel·lular passa a través d'interfases. Per tant, la importància dels mitjans microheterogenis és que permeten modelitzar el comportament dels fàrmacs en espais restringits biomimètics. El nombre de tècniques emprades per estudiar aquest comportament és molt ampli i variat, encara que els seus principals inconvenients són la manca de sensibilitat i reproductibilitat o un procediment experimental complicat. Recentment s'ha utilitzat la tècnica de fotòlisi de flaix làser (FDL) per a l'estudi de sistemes lligand-biomolècula i s'ha demostrat que l'estat excitat triplet és molt sensible al medi i, per tant, pot ser utilitzat com a sonda en complexos fàrmac-proteïna.

Amb aquests antecedents, s'ha desenvolupat una nova metodologia, basada en l'ús de les tècniques de FDL i de fluorescència, per obtenir informació rellevant sobre el tipus d'interaccions supramoleculares que tenen lloc entre fàrmacs i diferents entitats que actuen com a amfitrions. Així, s'han estudiat les espècies transitòries generades a partir de substrats seleccionats, utilitzant les seves propietats com a paràmetres quantitius dependents de les característiques del medi.

En primer lloc, s'han estudiat les propietats fotofísiques i fotoquímiques del nou agent calcimimètic (*R*)-cinacalcet (CIN). S'han identificat els principals processos de desactivació dels estats excitats i s'han determinat els seus temps de vida, així com els rendiments quàntics dels processos fotofísics implicats. Específicament, l'estat

excitat triplet del CIN és altament sensible al medi i el seu temps de vida en presència d'albumina sèrica humana (ASH) és considerablement més llarg que en dissolució. A més, la constant de velocitat de desactivació per oxigen al microambient proteic és dos ordres de magnitud menor que en dissolució. Així, s'ha observat que la proteïna proporciona al (*R*)-CIN un microambient que el protegeix de l'atac per oxigen, impedit els efectes fototòxics causats per la formació d'oxigen singlet ($^1\text{O}_2$) i augmentant en conseqüència la fotoseguretat del fàrmac.

Una vegada caracteritzats els estats excitats singlet i triplet de menor energia del (*R*)-CIN, s'ha aprofundit en el coneixement de les interaccions fàrmac-proteïna, estenent l'estudi a altres fàrmacs que també posseeixen cromòfor naftalè (NP) com són el (*S*)-naproxè ((*S*)-NPX) i el (*S*)-propranolol ((*S*)-PPN). Per tal de detectar una possible estereodiferenciació, la investigació també s'ha dut a terme amb els seus corresponents enantiòmers. Per a això, s'ha sintetitzat el (*S*)-CIN (no comercial) a partir de l'àcid 3-(trifluorometil)cinàmic. Posteriorment, s'han estudiat les interaccions entre els diferents substrats i sistemes binaris contenint albumina sèrica (AS) i α -glicoproteïna àcida (AAG) presents simultàniament, tant humanes com bovines. Analitzant les cinètiques de desaparició de l'estat excitat triplet obtingudes mitjançant FDL es dedueix que la principal proteïna transportadora del NPX és la AS, mentre que per al PPN és la AAG; el CIN constitueix un cas intermedi, ja que és transportat per dues proteïnes. No s'ha trobat una estereodiferenciació significativa en cap dels derivats del NP.

Un altre camp d'aplicació interessant de la FDL ha sigut l'estudi de la interacció fàrmac-fàrmac en el mateix lloc d'unió d'una proteïna transportadora (AAG humana i bovina). En el sistema PPN/CIN/AAG

s'ha observat que el primer estat excitat triplet del PPN interacciona eficientment amb el CIN, el que es tradueix en una disminució considerable del seu temps de vida. Aquesta desactivació pot explicar-se a través d'una transferència d'energia triplet-triplet (TETT) dins de l'únic lloc d'unió disponible a la AAG, el que està d'acord amb els valors relatius d'energia de triplet determinats per als dos fàrmacs. A més, els càlculs teòrics realitzats per al parell PPN/CIN, han confirmat que la disposició dels dos cromòfors a l'interior de la proteïna és compatible amb una TETT. Resultats similars s'han obtingut per a la nabumetona (NAB) en el sistema NAB/CIN/AAG.

Finalment, s'han emprat els estats excitats com sondes per investigar l'encapsulació dels fàrmacs (*R*)-CIN, (*S*)-PPN i (*S*)-NPX, així com del pro-fàrmac (*S*)-NPXMe (èster metílic de (*S*)-NPX), a l'interior de micel·les mixtes (MM). Per a això, s'han dut a terme experiments de desactivació de la fluorescència per iodur i de l'estat excitat triplet per nitrit, tant en dissolució com en MM. La disminució d'un ordre de magnitud de les constants de desactivació del PPN, del CIN i del NPXMe en MM s'associa amb una eficient encapsulació, mentre que no passa el mateix en el cas del NPX. Això pot ser degut a la diferent hidrofobicitat dels substrats, ja que el NPX posseeix un àcid carboxílic lliure en la seva estructura química i exhibeix una major solubilitat en medi aquós.

Summary

Drugs are used for therapeutic, diagnostic or preventive purposes and their transport towards the intracellular region occurs through interfaces. Hence, the importance of microheterogeneous media resides on the possibility of modeling the behavior of drugs in confined spaces. A wide number of techniques have been used to address this problem; however, their main drawbacks are associated with the lack of sensitivity and reproducibility or a complicated workup. Recently, laser flash photolysis (LFP) has been used for the study of ligand-biomolecule systems. It has been demonstrated that the triplet excited state is very sensitive to the environment and, therefore, it can be used as a probe in drug-protein complexes.

With this background, a new methodology has been developed, based on the use of LFP and fluorescence techniques, in order to obtain relevant information about the nature of the supramolecular interactions that take place between drugs and a variety of entities. Thus, transient species generated from selected substrates have been studied, using their properties as quantitative parameters that report on the characteristics of the medium.

First, photophysical and photochemical properties of the new calcimimetic agent (*R*)-cinacalcet (CIN) have been studied. The main deactivation processes of its excited states have been identified, and their lifetimes, as well as the quantum yields of the involved photophysical processes have been determined. Specifically, the triplet excited state of CIN is highly sensitive to the environment, and its lifetime in the presence of human serum albumin (HSA) is considerably

longer than in solution. Moreover, the rate constant of triplet quenching by oxygen in the protein is two orders of magnitude lower than in solution. Thus, the protein microenvironment protects (*R*)-CIN from attack by oxygen; this prevents the phototoxic effects caused by the generation of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and results in an enhanced photosafety of the drug.

After characterizing the lowest singlet and triplet excited states of (*R*)-CIN, further effort has been devoted to gain a more precise knowledge of drug-protein interactions. Thus, the study has been extended to other drugs, which also contain a naphthalene (NP) chromophore like (*S*)-naproxen ((*S*)-NPX) and (*S*)-propranolol ((*S*)-PPN). To detect a possible stereodifferentiation in the binding process, parallel studies have been conducted with their corresponding enantiomers. For this purpose, non-commercial (*S*)-CIN has been synthesized from 3-(trifluoromethyl)cinnamic acid. Subsequently, the interactions between different substrates and binary systems, with serum albumin (SA) and α -acid glycoprotein (AAG) simultaneously present in the same media, have been studied. Experiments have been performed in both human and bovine proteins. Fitting the decays of the triplet excited states generated by LFP has revealed that SA is the main carrier for NPX, whereas AAG plays this role for PPN; CIN constitutes an intermediate case, as it binds efficiently to both proteins. No significant stereodifferentiation has been found for any NP derivatives.

Another interesting field of application of LFP has been the study of drug-drug interactions in a common protein binding site of a carrier protein (human and bovine AAG). In the PPN/CIN/AAG system, it has been observed that the first triplet excited state of PPN interacts with

CIN, which results in a substantial decrease in the lifetime of the former. This deactivation can be explained by a triplet-triplet energy transfer (TTET) within the only binding site available within the AAG, which is in good accordance with the relative triplet energy values determined for both drugs. Moreover, theoretical calculations for the PPN/CIN system have confirmed that the spatial arrangement of both chromophores within the protein is compatible with TTET. Similar results have been obtained for nabumetone (NAB) in NAB/CIN/AAG systems.

Finally, singlet and triplet excited states have been used as probes to investigate the encapsulation of (*R*)-CIN, (*S*)-PPN, (*S*)-NPX, as well as (*S*)-NPXMe (methyl ester of (*S*)-NPX) within mixed micelles (MM). For this purpose, fluorescence and triplet excited state quenching experiments with iodide and nitrite, respectively, have been carried out, both in solution and in MM. The decrease by one order of magnitude in the quenching rate constants found for PPN, CIN and NPXMe in MM is associated with an efficient encapsulation, whereas this is not the case for NPX. The observed phenomenon can be due to the different hydrophobicity of the substrates, since NPX has a free carboxylic acid in its chemical structure and exhibits higher solubility in aqueous medium.

Contribuciones a congresos

- 1.- E. Nuin, M. C. Jiménez, I. Andreu, M. A. Miranda. **“Photophysical and Photochemical Study of Cinacalcet”**. IX CONGRESO DE FOTOQUIMICA, Septiembre **2009**, Leioa (España), Póster.

- 2.- I. Andreu, E. Nuin, M. C. Jiménez, M. A. Miranda. **“Photobiological Properties of Cinacalcet in Solution and Bound to Protein”**. XXIII IUPAC SYMPOSIUM ON PHOTOCHEMISTRY, Julio **2010**, Ferrara (Italia), Póster.

- 3.- M. C. Jiménez, R. Alonso, I. Andreu, V. Lhiaubet-Vallet, M. A. Miranda, S. Montanaro, E. Nuin. **“Dual Role of Transport Proteins for the Control of Photoreactivity”**. 7TH ERA-FLASH CONFERENCE: BIOINSPIRED CHEMISTRY, Octubre **2010**, Santiago de Compostela (España), Póster.

- 4.- E. Nuin, I. Andreu, M. A. Miranda. **“Influence of Solvent Polarity on the Photophysical Properties of Naphthalene-Based Bichromophoric Dyads”**. III JORNADAS IBÉRICAS DE FOTOQUÍMICA, Septiembre **2011**, Granada (España), Póster.

- 5.- C. Mayorga, A. Aranda, I. Andreu, M. I. Montanez, A. Ariza, I. Doña, N. Blanca-López, E. Nuin, M. Blanca, M. A. Miranda, M. J. Torres. **“Immediate Hypersensitivity to Quinolones: Drug Photodegradation Influences the Specific Basofil Activation”**. ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ACADEMY OF ALLERGY ASTHMA AND IMMUNOLOGY (AAAAI), Febrero **2012**, Orlando (EE.UU), Publicado en: *J. Allergy Clin. Immunol.* **2012**, 129, AB100.

- 6.- E. Nuin, M. Gómez-Mendoza, I. Andreu, M. L. Marín, M. A. Miranda.
**“Photophysical Probes to Assess the Potential of Cholic Acid
Aggregates as Drug Carriers”**. XXIV IUPAC: SYMPOSIUM ON
PHOTOCHEMISTRY, Julio 2012, Coimbra (Portugal), Póster.

Publicaciones

Publicaciones directamente derivadas de la presente tesis

- 1.- E. Nuin, I. Andreu, M. J. Torres, M. C. Jiménez, M. A. Miranda. **“Enhanced Photosafety of Cinacalcet upon Complexation with Serum Albumin”**. *J. Phys. Chem. B.* **2011**, *115*, 1158.
- 2.- R. Pérez-Ruiz, R. Alonso, E. Nuin, I. Andreu, M. C. Jiménez, M. A. Miranda. **“Naphthalene Triplet Excited State as a Probe for the Assessment of Drug Distribution in Binary Protein Systems”**. *J. Phys. Chem. B.* **2011**, *115*, 4460.
- 3.- E. Nuin, M. C. Jiménez, G. Sastre, I. Andreu, M. A. Miranda. **“Drug-Drug Interactions within Protein Cavities Probed by Triplet-Triplet Energy Transfer”**. *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 1603.
- 4.- E. Nuin, M. Gómez-Mendoza, M. L. Marín, I. Andreu, M. A. Miranda. **“Influence of Drug Encapsulation within Mixed Micelles on the Excited State Dynamics and Accessibility to Ionic Quenchers”**. *J. Phys. Chem. B.* (enviado)

Otras publicaciones relacionadas

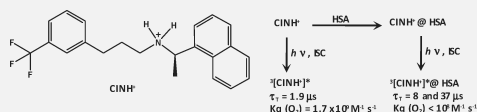
- 5.- I. M. Magin, N. E. Polyakov, E. A. Khramtsova, A. I. Kruppa, Yu. P. Tsentalovich, T. V. Leshina, M. A. Miranda, E. Nuin, M. L. Marín. **“Spin effects in intramolecular electron transfer in naproxen-N-methylpyrrolidine dyad”**. *Chem. Phys. Lett.* **2011**, *516*, 51.

- 6.- I. M. Magin, N. E. Polyakov, E. A. Khramtsova, A. I. Kruppa, A. A. Stepanov, P. A. Purto, T. V. Leshina, Yu. P. Tsentalovich, M. A. Miranda, E. Nuin, M. L. Marín. **“Spin Chemistry Investigation of Peculiarities of Photoinduced Electron Transfer in Donor–Acceptor Linked System”**. *Appl. Magn. Reson.* **2011**, *41*, 205.
- 7.- M. Gómez-Mendoza, E. Nuin, I. Andreu, M. L. Marín, M. A. Miranda. **“Photophysical Probes to Assess the Potential of Cholic Acid Aggregates as Drug Carriers”**. *J. Phys. Chem. B.* **2012**, *116*, 10213.
- 8.- E. Nuin, M. Gómez-Mendoza, I. Andreu, M. L. Marín, M. A. Miranda. **“New Photoactive Compounds To Probe Cholic Acid and Cholesterol inside Mixed Micelles”**. *Org. Lett.* **2012**, *15*, 298.
- 9.- C. Mayorga, I. Andreu, A. Aranda, I. Doña, M. I. Montanez, N. Blanca-Lopez, A. Ariza, E. Nuin, M. Blanca, M. A. Miranda, M. J. Torres. **“Fluoroquinolone Photodegradation Influences Specific Basophil Activation”**. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2013**, *160*, 377.
- 10.- E. Nuin, I. Andreu, U. Pischel, M. A. Miranda. **“Diastereomeric Differentiation of the Photophysics of Naproxen-Containing Dyads”** (en preparación)

Enhanced Photosafety of Cinacalcet upon Complexation with Serum Albumin

Eduarne Nuin,[†] Inmaculada Andreu,[†] M. José Torres,[‡] M. Consuelo Jiménez,[†] and Miguel A. Miranda^{*,†}[†]Departamento de Química-Instituto de Tecnología Química (UPV-CSIC), Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain[‡]Allergy Service, Research Laboratory, Carlos Haya Hospital, Málaga, Spain

ABSTRACT: Cinacalcet (CIN) is a calcimimetic drug, which contains a naphthalene chromophore and binds almost quantitatively to human serum albumin (HSA). In the present work, the excited states of CIN have been characterized in order to obtain relevant information about complexation of CIN with HSA. The fluorescence spectrum in acetonitrile, at $\lambda_{\text{exc}} = 290$ nm, displayed two bands with maxima at 332 and 439 nm, assigned to the monomer and exciplex emission. Upon protonation of the amino group, the exciplex band disappeared, with a concomitant increase of the monomer emission intensity. Time-resolved fluorescence evidenced an intramolecular dynamic quenching, attributed to exciplex formation and/or photoinduced electron transfer, in agreement with the favorable thermodynamics predicted by the Rehm–Weller equations. Diffusion controlled dynamic quenching of CIN^{H^+} fluorescence by oxygen was observed. The emission properties in PBS were similar to those obtained for CIN^{H^+} in acetonitrile. Laser flash photolysis (LFP) of CIN and CIN^{H^+} in acetonitrile/ N_2 , at $\lambda_{\text{exc}} = 308$ nm, gave rise to the naphthalene-like triplet excited states, with maxima at 420 nm and lifetimes of 4 and 7 μs ; they were efficiently quenched by oxygen. No significant singlet excited state interaction was observed in CIN^{H^+} /HSA complexes, as revealed by the emission spectra, which were roughly explained taking into account the relative contributions of drug and protein in the absorption spectra. Upon LFP of the complexes, triplet excited states were generated; the decays monitored at 420 nm were satisfactorily fitted using a function containing two monoexponential terms, corresponding to a short-lived ($\tau_1 = 8 \mu\text{s}$) and a long-lived ($\tau_2 = 37 \mu\text{s}$) component. This indicates that the drug is incorporated into two different binding sites of HSA. Despite the long triplet lifetimes of the CIN^{H^+} /HSA complexes, the rate constant of quenching by oxygen was found to be 2 orders of magnitude lower than that determined in acetonitrile, which can be attributed to the relative slower diffusion rates in this microheterogeneous system. Therefore, the protein microenvironment protects cinacalcet from attack by oxygen; this prevents the phototoxic effects caused by formation of singlet oxygen and results in an enhanced photosafety of the drug.

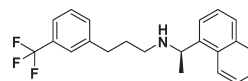


INTRODUCTION

Cinacalcet (CIN, Chart 1) is a recently marketed calcimimetic drug,^{1,2} which activates the calcium receptor (CaR) and inhibits parathyroid hormone (PTH) secretion, acting as a positive allosteric modulator of the CaR located on the surface of parathyroid cells.³ This calcimimetic agent is used for treatment of persistent hyperparathyroidism in renal transplanted patients, with chronic kidney disease and renal failure in dialysis.^{4–6} In addition to lowering serum PTH and calcium levels, clinical trials in patients with uncontrolled secondary hyperparathyroidism of uremia have demonstrated that CIN decreases serum phosphorus and combined calcium/phosphorus levels.⁷ It is also used for the treatment of hypercalcemia in patients with parathyroid carcinoma, by signaling the need to produce lower amounts of PTH in order to decrease the calcium level in blood.^{8–10} The pharmacological activity of CIN is mainly attributed to the (R) isomer.

Photophysical and photochemical studies on drugs containing a naphthalene (NP) chromophore, such as naproxen, propranolol, or nabumetone, have previously been reported.^{11–16} Singlet oxygen generation has been considered to be responsible for the phototoxic reactions associated with NP-derived drugs, as

Chart 1. Chemical Structure of (R)-Cinacalcet



this reactive species is able to produce damage to key biomolecules, such as proteins, lipids, or nucleic acids.^{17,18} Cinacalcet also contains a NP unit; therefore, it could in principle produce photobiological damage. However, no literature report on the possible phototoxicity of CIN has appeared as yet.

Cinacalcet binds almost quantitatively to human serum albumin (HSA), the major transport protein in humans.³ Since binding of a drug to serum proteins plays a significant role in pharmacokinetics, pharmacodynamics, toxicity, and clinical therapy,^{19–27} a detailed

Received: July 26, 2010

Revised: November 28, 2010

Published: December 23, 2010

understanding of CIN-HSA interactions becomes an important issue.

With this background, the goal of the present work is to characterize the excited states of CIN and to obtain relevant information about the complexation of CIN with HSA, using photophysical techniques such as fluorescence and laser flash photolysis. Specifically, it will be shown that the protein micro-environment protects the CIN triplet excited state from attack by oxygen, which implies a less efficient formation of singlet oxygen, thus reducing the photobiological risk.

EXPERIMENTAL METHODS

Materials and Solvents. Cinacalcet hydrochloride was extracted from commercial Mimpara 60 mg (Amgen, Spain). The content of six pills was powdered in a mortar, suspended in NH_4OH 1 M (50 mL) and extracted with CH_2Cl_2 (4×50 mL). The combined organic layers were washed with brine (3×150 mL) and water (3×150 mL), dried over MgSO_4 , and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography through silica gel 60 (dichloromethane:methanol:ammonium hydroxide 98:2:0.1 $v/v/v$) to give the corresponding free base of CIN as a colorless oil.

Human serum albumin (HSA, min. 99% fatty acid free) was purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Phosphate buffered saline solution (PBS, pH 7.4, 0.01 M) was prepared by dissolving Sigma tablets in the appropriate amount of deionized water. All other solvents used were of HPLC grade.

Absorption and Fluorescence Measurements. UV spectra were recorded on a Cary 300 (Varian) spectrophotometer. Steady-state fluorescence experiments were carried out using a Photon Technology International (PTI, Germany) LPS-220B spectrofluorometer, equipped with a monochromator in the wavelength range of 200–700 nm. The time-resolved fluorescence determinations were performed with a Time Master fluorescence lifetime spectrometer TM 2/2003 from PTI, using a hydrogen/nitrogen flash lamp as the excitation source. The kinetic traces were fitted by one or two monoexponential terms decay functions, with using a reconvolution procedure to separate from lamp pulse profile. For fluorescence measurements, concentrations were fixed by adjusting the absorbance of the solutions at the arbitrary value of 0.1 at the excitation wavelength of 290 nm. Fluorescence quantum yield (ϕ_F) of CIN in the presence of acetic acid was determined in acetonitrile, by comparison with 1-methylnaphthalene as standard ($\phi_s = 0.19$ in acetonitrile)²⁸ under anaerobic conditions, using eq 1

$$\phi_F = \phi_s \frac{n^2 I_i (1 - 10^{-A(\lambda_{\text{exc}})})}{n_s^2 I_s (1 - 10^{-A(\lambda_{\text{exc}})})} \quad (1)$$

where A is the absorbance at the excitation wavelength, I is the area under the corrected fluorescence spectrum, and n is the refractive index of the solvent. The subscripts “i” and “s” refer to CIN and the standard respectively. Emission measurements were performed in the region 300–560 nm, and the excitation in the range 200–310 nm. All measurements were performed at room temperature using 10×10 mm² quartz cells with 4 mL capacity under anaerobic conditions.

Laser Flash Photolysis. Laser flash photolysis (LFP) experiments were carried out with a pulsed XeCl excimer laser ($\lambda_{\text{exc}} = 308$ nm, ca. 17 ns pulse width, < 100 mJ per pulse) or a Nd:YAG

SL404G-10 Spectron Laser Systems ($\lambda_{\text{exc}} = 266$ nm, ca. 10 ns pulse width, < 10 mJ per pulse). In general, samples received between 1 and 3 pulses for all the kinetic experiments. A pulsed Lo255 Oriol Xenon lamp was used as detecting light source. The observation wavelength was selected with a 77200 Oriol monochromator, and the signal amplified by an Oriol photomultiplier tube (PMT) system made up of a 77348 side-on tube, 70680 housing, and a 70705 power supply. The signal was registered with a TDS-640A Tektronix oscilloscope and subsequently transferred to a personal computer. Concentrations of the samples were fixed by adjusting the absorbance of the solutions at the arbitrary value of 0.3 at the excitation wavelength. All transient spectra were recorded using 10×10 mm² quartz cells with 4 mL capacity and were bubbled for 10 min with N_2 , O_2 , or air before acquisition. Decay traces were registered at 420 nm. Experiments conducted in the presence of different protein concentrations were carried out on air-saturated PBS. Solutions were incubated 1 h in the dark before acquisition. In order to obtain deaerated solutions of CIN/HSA, experiments were performed using sodium sulfite (ca. 2×10^{-3} M) for chemical deoxygenation.²⁹ Triplet lifetimes of CIN in acetonitrile in the presence or absence of acid were obtained from the monoexponential fitting, whereas for CIN/HSA, a function with two monoexponential terms was needed. Triplet quantum yields (ϕ_T) of CIN and CINH^+ were determined in acetonitrile by comparison with 1-methylnaphthalene as standard ($\phi_T = 0.58$ in deaerated cyclohexane).²⁸ The $T-T$ molar absorption coefficients were estimated by the energy transfer method, using benzophenone as donor. They were found to be very similar to that reported for 1-methylnaphthalene (11 200).³⁰ It was assumed that this parameter does not change significantly in aqueous media. All measurements were performed at room temperature.

Singlet Oxygen Measurements. The singlet oxygen phosphorescence decay traces after the laser pulse were registered at 1270 nm employing a Peltier-cooled (-62.8 °C) Hamamatsu NIR detector operating at 588 V, coupled to a computer-controlled grating monochromator. A pulsed Nd:YAG L52137 V LOTIS TII was used at the excitation wavelength of 266 nm. The single pulses were ca. 10 ns duration, and the energy was lower than 10 mJ/pulse. The laser flash photolysis system consisted of the pulsed laser, a 77250 Oriol monochromator and an oscilloscope DP04054 Tektronix. The output signal from the oscilloscope was transferred to a personal computer. All measurements were made at room temperature, air atmosphere, using acetonitrile or D_2O (pD 7.4) as solvents in 10×10 mm² quartz cells with 4 mL capacity. The absorbance of the samples was 0.30 at the laser wavelength. The singlet oxygen quantum yield (ϕ_Δ) was determined for each compound using 1-methylnaphthalene in acetonitrile ($\phi_\Delta = 0.33$)³¹ or naproxen in D_2O at pD 7.4 ($\phi_\Delta = 0.25$)¹⁷ as standards. Singlet oxygen formations was calculated from the slope of the plots of signal intensity at zero time versus laser light intensity according to eq 2 using a set of neutral density filters to obtain different laser intensities.

$$\phi_{\Delta(\text{sample})} = \frac{I_{\text{sample}}}{I_{\text{standard}}} \phi_{\Delta(\text{standard})} \quad (2)$$

where I_{sample} is the emission intensity for the sample, I_{standard} is the emission intensity for the standard (1-methylnaphthalene

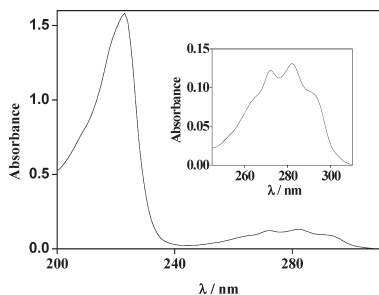


Figure 1. UV-vis absorption spectrum of CIN in acetonitrile 2×10^{-5} M. Inset: Magnification of the long-wavelength absorption region.

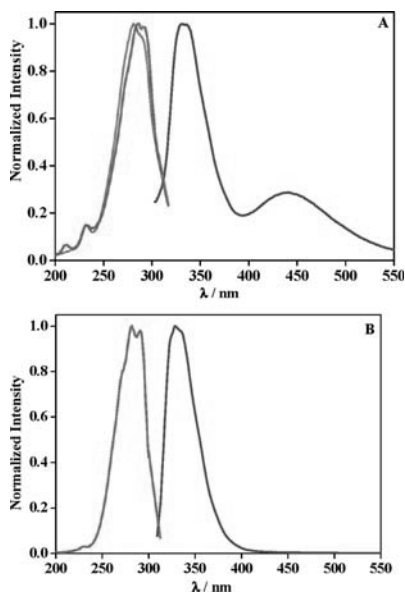


Figure 2. (A) Normalized emission and excitation spectra of CIN (2×10^{-5} M) in acetonitrile/ N_2 . Blue: emission, $\lambda_{\text{exc}} = 290$ nm, $A_{290} = 0.1$. Green: excitation, $\lambda_{\text{em}} = 320$ nm. Red: excitation, $\lambda_{\text{em}} = 420$ nm. (B) Normalized emission and excitation spectra of CIN in acetonitrile (2×10^{-5} M) / acetic acid (2×10^{-2} M) / N_2 . Blue: emission, $\lambda_{\text{exc}} = 290$ nm. Red: excitation, $\lambda_{\text{em}} = 320$ nm.

or naproxen), and $\phi_{\Delta(\text{standard})}$ is the quantum yield of singlet oxygen formation for the standard.

In general, the experiments were repeated at least three times with fresh samples. For each set of experiments, the obtained values were coincident within $\pm 5\%$ error margins.

RESULTS AND DISCUSSION

Photophysics of Cinacalcet in Acetonitrile. The absorption spectrum of CIN in acetonitrile is shown in Figure 1. It exhibits a fine-structured band reaching beyond 300 nm, typical of naphthalene derivatives.^{13,14}

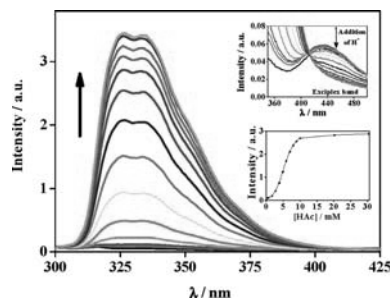


Figure 3. Fluorescence spectra of CIN in acetonitrile/ N_2 ($\lambda_{\text{exc}} = 290$ nm, $A_{290} = 0.02$) in the presence of increasing amounts of acetic acid ($0-3 \times 10^{-2}$ M). Upper inset: magnified traces between 350 and 500 nm. Lower inset: emission intensity at 332 nm vs acetic acid concentration.

Emission studies were performed by excitation at 290 nm in deaerated acetonitrile. The spectrum displayed two bands with maxima at 332 and 439 nm (Figure 2A); their intensity was very low compared with emission of 1-methylnaphthalene as standard, suggesting efficient intramolecular quenching by the amino group. The long wavelength band was in principle attributed to an intramolecular exciplex, based on the fact that the excitation spectra for the two bands were nearly identical.

Interestingly, in the presence of acetic acid (2×10^{-2} M), where the amino group should be completely protonated, the longer wavelength band disappeared (Figure 2B), and the intensity of the monomer band was much higher. Actually, addition of increasing amounts of acetic acid (0–30 mM) to an acetonitrile solution of CIN resulted in a dramatic increase of the 332 nm band, accompanied by the progressive disappearance of the exciplex emission at 439 nm (Figure 3). The absorption spectrum did not show any significant difference upon addition of acetic acid. This is in good agreement with an intramolecular singlet excited state interaction between the naphthalene moiety and the amino group, which is disrupted in acidic medium.

From the intersection between normalized excitation and emission bands, a singlet energy value of 91 kcal/mol was obtained, both for the protonated (CINH^+) and the neutral forms (Table 1). Fluorescence quantum yield (ϕ_F) of CIN under different conditions was determined using 1-methylnaphthalene as standard ($\phi_F = 0.19$); the values are also shown in Table 1. In the case of CINH^+ , ϕ_F was comparable to that of the standard; however, in the absence of acid the value was 2 orders of magnitude lower. Time-resolved fluorescence experiments evidenced an intramolecular dynamic quenching, as expected for exciplex formation. Thus, decay traces at $\lambda_{\text{em}} = 320$ nm in acetonitrile under N_2 , fitted to a monoexponential function with a lifetime (τ_F) of 40 ns in acidic medium; by contrast, τ_F was remarkably shorter in the absence of acetic acid (Table 1).

The nature of monomer fluorescence quenching by the amine moiety could be attributed either to photoinduced electron transfer (which is a typical process in naphthalene derivatives)^{14,32} or to exciplex formation.³³ Using the Rehm–Weller equations (eqs 3 and 4), where E_{ox} is the oxidation potential of the donor (diethylamine, 1.01 V),³⁴ E_{red} is the reduction potential of acceptor (1-methylnaphthalene, -2.58 V), E_{0-0} is the singlet energy of CIN (91 kcal/mol), ϵ is the acetonitrile dielectric constant (37.5 F/m), μ^2/ρ^3 is taken as 0.75,¹³ the

Table 1. Photophysical Parameters Obtained for CIN in Acetonitrile, under Different Conditions^a

parameters	CIN	CINH ⁺
E_S (kcal/mol)	91	91
ϕ_F (N ₂)	<0.01	0.14
ϕ_F (air)	<0.01	0.07
ϕ_F (O ₂)	<0.01	0.02
τ_F (ns)	<1	40
k_{Fq} (M ⁻¹ s ⁻¹) ^b		1.7×10^{10}
ϕ_T (N ₂)	0.60	0.53
ϕ_T (air)	0.53	0.49
ϕ_T (O ₂)	0.34	0.43
τ_T (μ s)	4.0	7.0
k_{Tq} (M ⁻¹ s ⁻¹) ^b	1.6×10^9	9.8×10^8
ϕ_{Δ} (air)	0.35	0.35

^a Relative errors lower than 5% of the stated values. ^b Rate constant for fluorescence or triplet quenching by oxygen.

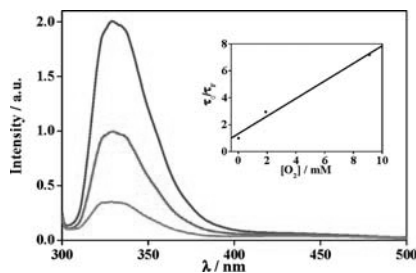


Figure 4. Quenching of CINH⁺ fluorescence by oxygen. Emission spectra recorded in acetonitrile (2×10^{-5} M) / acetic acid (2×10^{-2} M) ($\lambda_{exc} = 290$ nm) under nitrogen (blue), air (red), and oxygen (green). Inset: Stern–Volmer plots obtained from lifetime measurements.

estimated values of ΔG_{ex} and ΔG_{et} were found to be -4.6 and -9.9 kcal mol⁻¹, respectively.

$$\Delta G_{ex} = E_{ox} - E_{red} - \frac{E_0 - 0}{23} - \frac{\mu^2}{\rho^3} \left(\frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - 0.19 \right) + 0.38 \quad (3)$$

$$\Delta G_{et} = E_{ox} - E_{red} - \frac{E_0 - 0}{23} + \frac{2.6}{\epsilon} - 0.13 \quad (4)$$

The favorable ΔG_{ex} estimation is in agreement with experimental observation of the 439 nm exciplex band; however, the low intensity of this long wavelength emission does not account for the almost complete disappearance of the monomer band. This suggests that the contribution of exergonic intramolecular electron transfer to the observed quenching must be significant.

Furthermore, quenching of CINH⁺ fluorescence by oxygen was observed to take place (Figure 4). Basically, this was found to be dynamic in nature, as indicated by the shortening of fluorescence lifetimes in the presence of increasing amounts of oxygen. The rate constant for this process was obtained from the Stern–Volmer plots (see Insert in Figure 4) and found to be nearly diffusion controlled (value in Table 1).

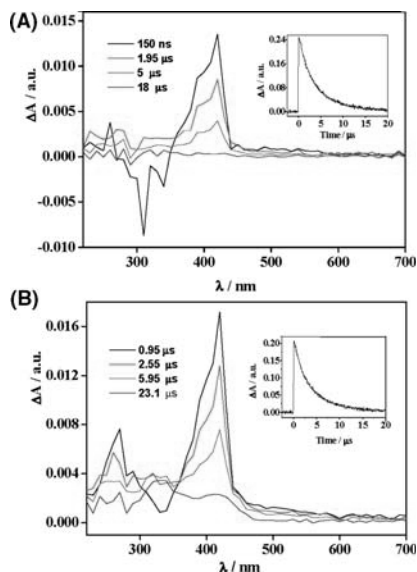


Figure 5. Laser flash photolysis of CIN (A) and CINH⁺ (B) in acetonitrile/N₂. Absorbance of the samples was 0.3 at the laser excitation wavelength (308 nm). Spectra obtained at different delay times after the laser pulse. Insets: decay traces monitored at $\lambda_{max} = 420$ nm.

Laser flash photolysis studies were performed on CIN and CINH⁺ in acetonitrile/N₂ at $\lambda_{exc} = 308$ nm. In both cases, the naphthalene-like triplet excited states were detected as transient absorptions with maxima at 420 nm (Figure 5, panels A and B), which were efficiently quenched by oxygen. The decay kinetics of these transient species (³CIN* and ³CINH⁺*) are shown in the corresponding insets. Their fitting led to triplet lifetime values of 4 and 7 μ s for CIN and CINH⁺, respectively.

The intersystem crossing quantum yields of CIN and CINH⁺ were determined using 1-methylnaphthalene in cyclohexane as standard ($\phi_T = 0.58$).³⁸ The obtained values are shown in Table 1. It is remarkable that triplet formation for the neutral form of CIN was unusually efficient, considering the extensive intramolecular quenching of its singlet excited state precursor. This suggests that alternative pathways are available to populate ³CIN*, namely back electron transfer at the radical ion pair or intersystem crossing at the exciplex. On the other hand, the lack of correspondence between the ϕ_F and ϕ_T values of CINH⁺ under N₂, air and O₂ (Table 1) indicated that fluorescence quenching by oxygen contributes to formation of ³CINH⁺*, via a charge-transfer complex.^{31,35} Scheme 1 summarizes the different mechanistic pathways interconnecting the excited states of CIN and CINH⁺.

In this context, it is known that oxygen quenching of singlet excited states may yield triplet states by enhanced intersystem crossing.^{31,36} As a result, ¹O₂ may be produced, provided that the singlet–triplet energy gap is higher than 23 kcal/mol. In naphthalene derivatives, although this requirement is fulfilled (31 kcal/mol in the case of CINH⁺) triplet quenching has been proven to be the almost exclusive source of ¹O₂. As a matter

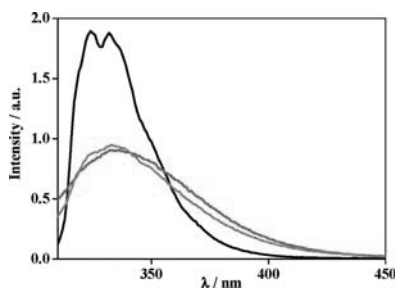
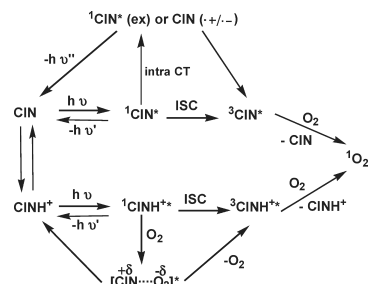
Scheme 1. Mechanistic Pathways of the CIN and CINH⁺ Excited States

Figure 6. Fluorescence spectra of CINH⁺ in PBS (black) and in PBS/HSA at 1:1 drug/protein molar ratio (green). Protein emission in the absence of CINH⁺ is also shown (red trace). In all cases, the absorbance of the sample at 290 nm was fixed at 0.1.

of fact, the excited triplet states of CIN and CINH⁺ were quenched by oxygen; the corresponding rate constants were determined using the Stern–Volmer relationships and are given in Table 1. The singlet oxygen quantum yields were determined for the NIR phosphorescence emission at 1270 nm and found to be 0.35 (see Table 1).

Photophysics of Cinacalcet/Protein Complexes in Neutral Aqueous Medium. The emission spectrum of CINH⁺ in PBS was measured at 290 nm ($A_{290} = 0.1$), under air. As the reported pK_a value of CIN is 8.72,³⁷ basically all the compound is protonated under the employed experimental conditions (pH 7.4). Parallel measurements were made in the presence of equimolar amounts of HSA, and a control experiment was performed with the protein alone (Figure 6 and Table 2).

As expected, the protein displayed the typical emission maximum at 340 nm, corresponding to its only tryptophan residue;³⁸ hence, both HSA and CINH⁺ absorb and emit in the same wavelength range, making it difficult to determine ϕ_F and τ_F in an accurate way. The $\phi_F = 0.06$ given in Table 2 corresponds to the combined emission of the drug and the protein; however the intrinsic ϕ_F of the CINH⁺@HSA complex must be very similar to the value found in the absence of protein (0.08). Actually, the emission of a 1:1 CINH⁺/HSA mixture (Figure 6) roughly matched the simulated trace, taking into account the relative contributions of free protein and drug in the absorption spectrum. Thus, no protein-to-drug energy transfer was observed in

Table 2. Photophysical Parameters Obtained for CINH⁺ in Aerated PBS^a

parameters	CINH ⁺	CINH ⁺ /HSA
ϕ_F	0.08	0.06
τ_F (ns)	30	ND ^b
ϕ_T	0.49 ^c	0.56
τ_T (μ s)	1.9 ^c	8 and 37
k_{Tq} ($M^{-1} s^{-1}$) ^d	1.7×10^9	5.4×10^7
ϕ_Δ (air)	0.35	ca. 0

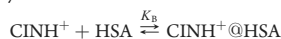
^a Relative errors lower than 5% of the stated values. ^b ND: not determined, as emission contained both tryptophan and CINH⁺ contributions. ^c Excitation wavelength: 266 nm. ^d Rate constant for triplet quenching by oxygen.

the complex. Similar behavior has been observed for related naphthalene derivatives.²²

Transient absorption spectroscopy was carried out in air-saturated PBS solutions. Unfortunately, the solubility of CINH⁺ in this medium was found to be very limited, so it was not possible to prepare clear solutions of the appropriate absorbance (0.3) at 308 nm. Therefore, measurements were also performed using 266 nm as excitation wavelength. Interestingly, this problem was circumvented in the presence of equimolar amounts of HSA, where the drug was completely soluble, indicating efficient formation of the expected complexes.

After incubation for 30 min in the dark, transient absorption spectra were obtained (Figure 7A); they were assigned to the triplet–triplet transition, by comparison with the spectra of CIN in acetonitrile (see above). The decays monitored at 420 nm (Figure 7B) were satisfactorily fitted using a function containing two monoexponential terms, corresponding to a short-lived ($\tau_1 = 8 \mu$ s) and a long-lived ($\tau_2 = 37 \mu$ s) component. This indicates that the drug is incorporated into two different binding sites of HSA, with relative contributions (estimated from the preexponential factors) of 45% and 55%, respectively. To rule out that the short-lived component is due to free CINH⁺ in the bulk solution, increasing amounts of HSA were added; as a matter of fact, the 8 μ s contribution remained unaltered, confirming the initial assignment.

Determination of binding constants was achieved from laser flash photolysis experiments at $\lambda_{exc} = 266$ nm on solutions of CIN in PBS (5×10^{-5} M), varying HSA concentrations in the range $(4-6) \times 10^{-5}$ M. For a reversible binding to HSA leading to a 1:1 complex (CINH⁺@HSA), the equilibrium is represented by



$$K_B = \frac{[\text{CINH}^+@ \text{HSA}]}{[\text{CINH}^+][\text{HSA}]}$$

where K_B is the binding constant, [CINH⁺@HSA] is the concentration of the complex, and [CINH⁺] and [HSA] are concentrations of the noncomplexed species in solution. The required concentrations were obtained by fitting the triplet decay traces at 420 nm, as the contribution of three terms with different lifetimes (free, site-I bound, and site-II bound CINH⁺). Since the relative population of the two protein sites was comparable (see above), the affinities were assumed to be similar; hence, the percentages of the two bound components were combined to obtain an average K_B value that was found to be $6.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

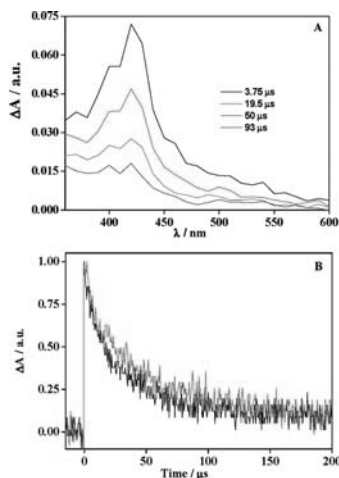


Figure 7. Laser flash photolysis of CINH^+ in the presence of HSA, at 1:1 molar ratio, under aerobic conditions. Absorbance of the samples was 0.3 at the laser excitation wavelength (308 nm). (A) Spectra obtained at different delay times after the laser pulse. (B) Normalized decay traces monitored at $\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ nm}$ for CINH^+ in the absence (black) and in the presence of sulfite (red).

From the intensity of the triplet signal immediately after the laser pulse, an intersystem crossing quantum yield of 0.56 was determined for CINH^+ within the protein binding sites, under aerobic conditions, which is similar to that found in acetonitrile. To investigate triplet quenching by oxygen in the protein microenvironment, CINH^+ /HSA solutions were submitted to chemical deoxygenation by addition of sodium sulfite (ca. $2 \times 10^{-3} \text{ M}$). Despite the long triplet lifetimes in this medium, the rate constant was found to be 2 orders of magnitude lower than that determined in the bulk solution ($5.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). This can be attributed to the relative diffusion rates, which tend to be slower in microheterogeneous systems. As a consequence, the singlet oxygen quantum yield inside the protein was found to be nearly negligible, while its value was $\phi_{\Delta} = 0.35$ in the bulk aqueous solution.

CONCLUSIONS

Cinacalcet is a naphthalene-containing photoactive drug. Both in organic and aqueous media, its most remarkable photophysical property from the biological point of view is formation of the triplet excited state, with a relatively high quantum yield. Upon administration to patients, this drug is known to bind almost completely to human serum albumin; in the resulting complexes, the triplet lifetime is remarkably longer than in the bulk solution. More importantly, the rate constant of triplet quenching by oxygen is 2 orders of magnitude lower than in solution, which can be attributed to the relative slower diffusion rates in this microheterogeneous system. Therefore, the protein microenvironment protects cinacalcet from attack by oxygen; this prevents the phototoxic effects caused by formation of singlet oxygen and results in an enhanced photosafety of this drug.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: mmiranda@qim.upv.es.

ACKNOWLEDGMENT

Financial support from the MICINN (Grant CTQ2007-67010), from the Generalitat Valenciana (Prometeo Program, ref 2008/090) and from Carlos III Institute of Health (Grant RIRAAF, RETICS program) is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Andrew, M. P. *Kidney* **2009**, *18*, 175.
- Kumar, G. N.; Sproul, C.; Poppe, L.; Turner, S.; Gohdes, M.; Ghorrah, H.; Padhi, D.; Roskos, L. *Drug Metab. Dispos.* **2004**, *32*, 1491.
- Nagano, N. *Pharmacol. Therapeut.* **2006**, *109*, 339.
- Kawata, T.; Imanishi, Y.; Kobayashi, K.; Onoda, N.; Okuno, S.; Takemoto, Y.; Komo, T.; Tahara, H.; Wada, M.; Nagano, N.; Ishimura, E.; Miki, T.; Ishikawa, T.; Inaba, M.; Nishizawa, Y. *J. Bone Miner. Metab.* **2006**, *24*, 300.
- Kruse, A. E.; Eisenberger, U.; Frey, F. J.; Mohaupt, M. G. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2005**, *20*, 1311.
- Apostolou, T.; Damianou, L.; Kotsiev, V.; Drakopoulos, S.; Hadjicostantinou, V. *Clin. Nephrol.* **2006**, *65*, 374.
- Lindberg, J. S.; Culletton, B.; Wong, G.; Borah, M. F.; Clark, R. V.; Shapiro, W. B.; Roger, S. D.; Husserl, F. E.; Klassen, P. S.; Guo, M. D.; Albizem, M. B.; Coburn, J. W. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2005**, *16*, 800.
- Silverberg, S. J.; Rubin, M. R.; Faiman, C.; Peacock, M.; Shoback, D. M.; Smalldridge, R. C.; Schwanauer, L. E.; Olson, K. A.; Klassen, P.; Bilezikian, J. P. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2007**, *92*, 3803.
- Szmulowicz, E. D.; Utiger, R. D. *Nature Rev. Endocrinol.* **2006**, *2*, 291.
- Rodgers, S. E.; Perrier, N. D. *Curr. Opin. Oncol.* **2006**, *18*, 16.
- Birks, J. B. *Photophysics of Aromatic Molecules*; Wiley: New York, 1970.
- Yin, G. Z.; Nicol, M. F. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 1171.
- Abad, S.; Pischel, U.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 2711.
- Jiménez, M. C.; Pischel, U.; Miranda, M. A. *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* **2007**, *8*, 128.
- Sortino, S.; Petralia, S.; Boscá, F.; Miranda, M. A. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 136.
- Boscá, F.; Canudas, N.; Marín, M. L.; Miranda, M. A. *Photochem. Photobiol.* **2000**, *71*, 173.
- De la Peña, D.; Martí, C.; Nonell, S.; Martínez, L. A.; Miranda, M. A. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 828.
- Pierlot, C.; Hajjam, S.; Barthélémy, C.; Aubry, J. M. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1996**, *36*, 31.
- Moser, J.; Boscá, F.; Lowell, W. W.; Castell, J. V.; Miranda, M. A.; Hye, A. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2000**, *58*, 13.
- Lhiaubet-Vallet, V.; Boscá, F.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 423.
- Vayá, L.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 9363.
- Vaya, L.; Perez-Ruiz, R.; Lhiaubet-Vallet, V.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *486*, 147.
- Montanaro, S.; Lhiaubet-Vallet, V.; Jiménez, M. C.; Blanca, M.; Miranda, M. A. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1196.
- Carter, D. C.; Ho, J. X. *Adv. Protein Chem.* **1994**, *45*, 203.
- Frostell-Karlsson, A.; Remaeus, A.; Roos, H.; Andersson, K.; Borg, P.; Hämäläinen, M.; Karlsson, R. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1986.
- Beaudry, F.; Coutu, M.; Brown, N. K. *Biomed. Chromatogr.* **1999**, *13*, 401.
- Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N. *Mol. Pharmacol.* **1976**, *12*, 1252.

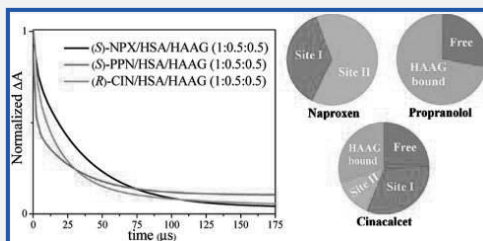
- (28) Murov, S. L. *Handbook of Photochemistry*; Marcel Dekker: New York, 1993.
- (29) Wei, Y.; Chuan, D.; Liu, D.; Shuang, S.; Huie, C. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 761.
- (30) Carmichael, I.; Hug, G. L. *J. Phys. Ref. Data* **1986**, *15*, 1.
- (31) Wilkinson, F.; McGarvey, D. J.; Olea, A. F. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 3762.
- (32) Pina, F.; Lima, J. C.; Lodeiro, C.; Seixas de Melo, J.; Diaz, P.; Albelda, M. T.; García-España, E. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 8207.
- (33) Suzuki, I.; Kato, Y.; Egawa, Y.; Anzai, J.-I.; Wadamori, M.; Yokomizo, H.; Takahashi, K. *J. Mol. Struct.* **2002**, *602–603*, 223.
- (34) Show, Y. L.; Danen, W. C.; Nelsen, S. F.; Roseblatt, D. H. *Chem. Rev.* **1978**, *78*, 243.
- (35) Kristiansen, M.; Scurlock, R. D.; Iu, K.-K.; Ogilby, P. R. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 5190.
- (36) Iu, K.-K.; Ogilby, P. R. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 1611.
- (37) www.amgen.ca/Sensipar_PM.pdf.
- (38) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer Science + Business Media, LLC: New York, 2006.

Naphthalene Triplet Excited State as a Probe for the Assessment of Drug Distribution in Binary Protein Systems

Raúl Pérez-Ruiz, Rafael Alonso, Edurne Nuin, Inmaculada Andreu, M^a Consuelo Jiménez,* and Miguel A. Miranda*

Departamento de Química, Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, Spain

ABSTRACT:



Three drugs containing the naphthalene (NP) chromophore, namely, naproxen (NPX), propranolol (PPN), and cinacalcet (CIN), but with different affinities toward serum albumins (SAs) and α -1-acid glycoproteins (AAGs) have been employed for the assessment of drug distribution in binary SA/AAG systems. These three drugs represent an appropriate choice for checking whether a methodology based on transient absorption spectroscopy of a given reporter can be employed for discrimination between different distribution patterns in multicompartimental biological media. Thus, upon laser flash photolysis (LFP) of NPX, PPN, and CIN in the presence or absence of proteins, the NP triplet excited state ($^3\text{NP}^*$) at ~ 420 nm was always detected, although the kinetics of the decay traces was structure- and medium-dependent. In aerated PBS, only a very short triplet lifetime (τ_T) was found ($1-2 \mu\text{s}$). By contrast, in the presence of SAs, two longer triplet lifetimes ($5-76 \mu\text{s}$) were observed, ascribed to $^3\text{NP}^*$ within site I and site II. Upon binding to AAGs, only a long τ_T ($15-47 \mu\text{s}$) was found. When the two proteins were present simultaneously in the same media, fitting of the decay traces was clearly consistent with a distribution of the drug between the different biological compartments and the bulk solution, which correlates well with the known protein affinities of every drug. Experiments were performed in both human (HSA/HAAG) and bovine protein media (BSA/BAAG). The results showed that SAs are the major carriers for NPX; by contrast, PPN binds preferentially to AAGs. An intermediate situation was found for CIN, which presents comparable affinity for both proteins. The results obtained for the two enantiomers of each drug were very similar, although a small stereodifferentiation was observed between the triplet lifetimes in the protein binding sites.

■ INTRODUCTION

Transport proteins, such as serum albumins (SAs) and α -1-acid glycoproteins (AAGs) are carriers of exogenous and endogenous substances in the bloodstream.¹ The interaction of SAs with small molecules (i.e., drugs, metabolites, or fatty acids) has been widely investigated using different techniques to gain insight into the mechanism of transport processes and to establish the structural basis for designing new therapeutic agents.² For human serum albumin (HSA), Sudlow and co-workers found two primary high-affinity binding sites, called site I (warfarin) and site II (indole-benzodiazepine), with association constants in the range of 10^4-10^7 M^{-1} .³ In addition, lower-affinity sites can also be populated, although to a lower extent.⁴ Bovine serum albumin (BSA) has often been used as a model for HSA due to their similarity (76% amino acid sequence identity), although BSA contains two Trp residues instead of one. Concerning AAGs, they are one of the major types of acute phase

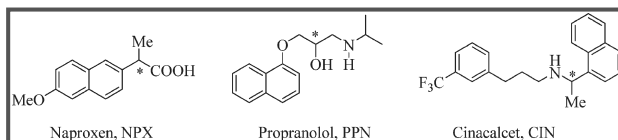
plasma proteins. Up to seven binding sites have been described for human AAG (HAAG); however, most drugs and small organic molecules bind almost exclusively to one of them.⁵ Interaction of some ligands with bovine AAG (BAAG) has been studied by fluorescence techniques, revealing the presence of a basic drug and a steroid hormone binding site.⁶ While SAs are the most abundant proteins in plasma under regular conditions, their concentration drops significantly in many diseases, such as inflammatory processes. The reverse is true for AAGs under similar conditions. The interaction between drugs and transport proteins in biological systems plays a key role in pharmacokinetics,⁷ being crucial for understanding biodistribution, metabolism, elimination, or pharmacological effects in the body.

Received: December 10, 2010

Revised: February 19, 2011

Published: March 28, 2011

Chart 1



Scheme 1. Synthesis of (S)-CIN

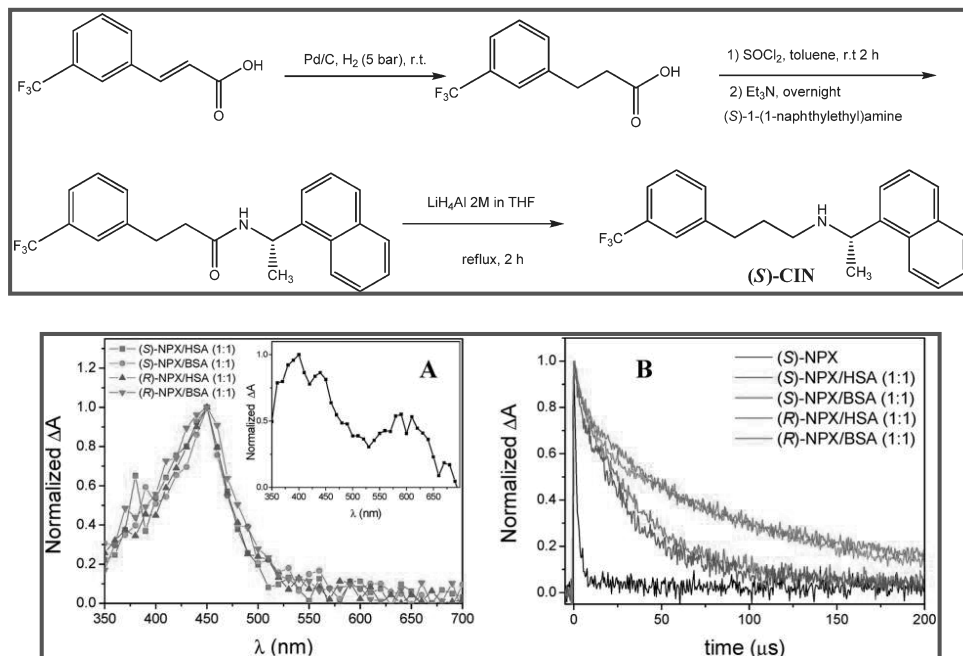


Figure 1. (A) Transient absorption spectra for (S)-NPX (2×10^{-4} M, PBS 0.01 M, pH = 7.4, $\lambda_{exc} = 308$ nm) obtained 2 μ s after the laser pulse, in the presence of SAs. (Inset) Spectrum obtained in the absence of proteins. (B) Decays for NPX (2×10^{-4} M, PBS 0.01 M, pH = 7.4, $\lambda_{exc} = 308$ nm, $\lambda_{em} = 440$ nm, air).

Thus, a real time investigation of the competing interactions between drugs and SAs/AAGs present simultaneously in the same medium emerges as an important issue, difficult to address by the existing analytical tools. Investigation of ligand binding to a single protein is typically performed by ultrafiltration, liquid chromatography, circular dichroism, capillary electrophoresis, NMR spectroscopy, fluorescence measurements, biochemical assays, and so forth. Unfortunately, none of these techniques is appropriate for a fast and consistent quantification of drug distribution between two different proteins naturally occurring in the same biological medium. With this background, the development of appropriate methodologies would be very useful, especially in the context of a more general type of problem, where microheterogeneous biological systems composed of different compartments are accessible for low-molecular-weight ligands.⁸

Table 1. Triplet Lifetimes of (S)- and (R)-NPX Bound to HSA and BSA Determined by LFP at a 1:1 Drug/Protein Molar Ratio

	protein	τ_1 (μ s)	τ_{11} (μ s)
(S)-NPX	HSA	10.1	48.3
(S)-NPX	BSA	5.0	76.0
(R)-NPX	HSA	7.5	37.7
(R)-NPX	BSA	7.0	69.1

We have recently reported the use of triplet excited states as reporters for the binding of drugs to transport proteins, based on the fact that the properties of these transient species (in particular, the lifetime) are highly sensitive to the micro-environment. This methodology, based on the use of laser flash

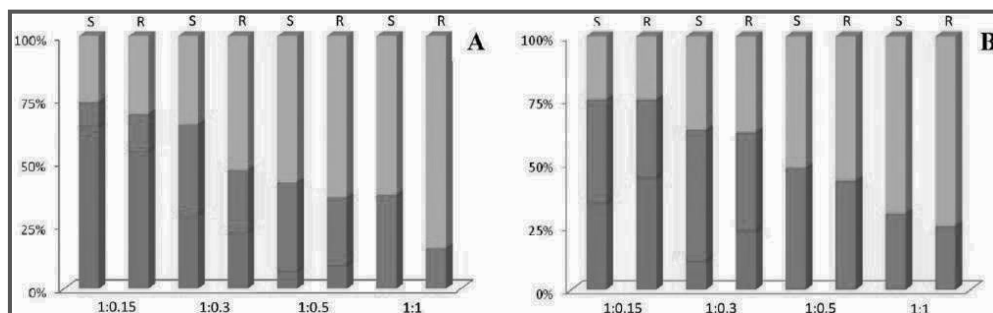


Figure 2. Percentage of free (blue), site I-bound (red), and site II-bound (green) (S)- or (R)-NPX at different NPX/HSA (A) or NPX/BSA (B) molar ratios.

Table 2. Triplet Lifetimes and Percentages of (S)- and (R)-NPX Bound to HAAG and BAAG Determined by LFP at a 1:1 Drug/Protein Molar Ratio

	protein	τ_B (μs)	% NPX bound
(S)-NPX	HAAG	21.9	19
(S)-NPX	BAAG	26.7	57
(R)-NPX	HAAG	22.7	19
(R)-NPX	BAAG	30.1	47

photolysis (LFP), has been successfully applied to protein binding of flurbiprofen (FBP) or its methyl ester (FBPMe), determination of enantiomeric composition in mixtures of (S)- and (R)-FBP, or investigation of the glucuronidase activity of HSA toward FBP glucuronide (FBPgluc).⁹

In a previous Letter, we presented preliminary results on the binding behavior of FBP and FBPMe in binary SAs/AAGs systems.¹⁰ After proving the principle, we have now extended the studies to a group of drugs containing the naphthalene (NP) chromophore; the obtained results indicate that the new LFP-based methodology may indeed be of general applicability for the assessment of drug distribution between two proteins present in the same medium.

The selected drugs are naproxen (NPX), propranolol (PPN), and cinacalcet (CIN); their structures are shown in Chart 1. The first one is a nonsteroidal anti-inflammatory drug employed for the reduction of pain, fever, and inflammation. It is known that NPX binds efficiently to SAs (preferentially to site II), with association constants (K_B) in the range of 10^6 – 10^7 M^{-1} .¹¹ Regarding PPN, it is a nonselective beta blocker used for the treatment of hypertension, which exhibits lower affinity than NPX for SAs (with K_B values on the order of 10^3 M^{-1});¹² by contrast, PPN binds strongly to HAAG ($K_B = (2-4) \times 10^6$ M^{-1}).¹³ Finally, the calcimimetic CIN is prescribed for persistent hyperparathyroidism in renal transplant patients with chronic kidney disease and renal failure in dialysis; at therapeutic doses, in blood, it is found to be quantitatively bound to transport proteins.¹⁴ Thus, these three drugs, which share a common NP chromophore, exhibit a different binding behavior toward SAs or AAGs. Hence, they are suitable systems for checking whether transient absorption spectroscopy of a given reporter (NP triplet) can be employed for discrimination between different distribution patterns in SA/AAG binary systems.

The photophysical properties of NPX, PPN, and CIN in solution have already been established.^{14,15} In all cases, the triplet excited state is detected as a transient absorption band centered at ~ 420 – 440 nm, with moderate quantum yields (0.28–0.60) and lifetimes in the microsecond range. Here, the percentage of drug in the different biological compartments available in SA/AAG binary systems is determined from the fitting of the triplet decay curves (Figure 1). Parallel studies have been conducted with the (S)- and (R)-enantiomers, in order to detect a possible stereodifferentiation in the binding process.

EXPERIMENTAL METHODS

Materials and Solvents. Proteins: HSA (96–99%), BSA (98–99%), HAAG (99%), and BAAG (99%) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Phosphate buffered saline solution (PBS, pH = 7.4, 0.01 M) was prepared by dissolving Sigma tablets in the appropriate amount of deionized water.

The pure enantiomers (S)-NPX, (R)-NPX, (S)-PPN, and (R)-PPN were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), whereas (R)-CIN hydrochloride was extracted from commercial Mimpara 60 mg (Amgen, Spain). The content of six pills was powdered in a mortar, suspended in NH_4OH 1 M (50 mL), and extracted with CH_2Cl_2 (4×50 mL). The combined organic layers were washed with brine (3×150 mL) and water (3×150 mL), dried over MgSO_4 , and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography through silica gel 60 (dichloromethane/methanol/ammonium hydroxide 98:2:0.1 v/v/v) to give the corresponding free base of (R)-CIN as a colorless oil. The synthesis of (S)-CIN was achieved in three steps following a known procedure (Scheme 1). The intermediates were obtained, purified, and fully characterized as follows.

3-[3-(Trifluoromethyl)phenyl]propanoic Acid. This was prepared by hydrogenation of 3-(trifluoromethyl)cinnamic acid (150 mg, 0.69 mmol) in methanol (2 mL) and 10% palladium on carbon under hydrogen pressure (5 bar) in a reinforced glass reactor equipped with pressure controllers, at room temperature for 1.5 h. After this time, the reaction mixture was filtered through a pad of Celite, and the filtrate was distilled under reduced pressure. The title compound was obtained in quantitative yield as a colorless oil, whose ^1H NMR data were found to be coincident

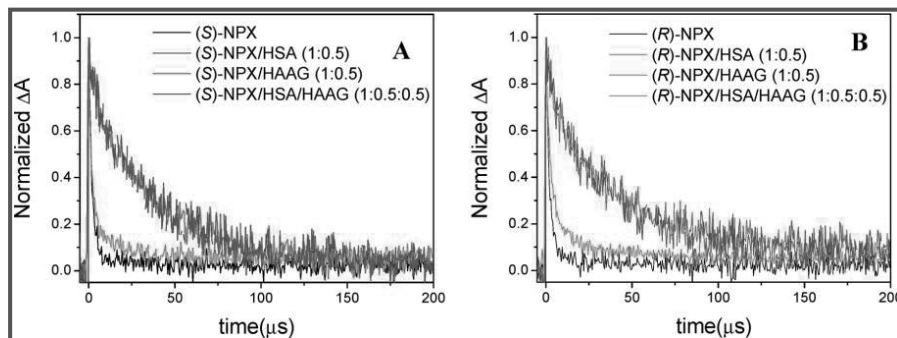


Figure 3. Decays for NPX (2×10^{-4} M, PBS 0.01 M, pH = 7.4, $\lambda_{\text{exc}} = 308$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 440$ nm, air) in the presence of HSA and HAAG. (A) (S)-NPX. (B) (R)-NPX.

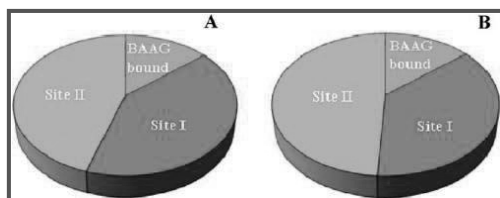


Figure 4. Percentage of BAAG-bound (orange), site-I-bound (red) and site-II-bound (green) NPX in SA/AAG binary systems at a 1:0.5:0.5 NPX/SA/AAG molar ratio, as determined by LFP. (A) (S)-NPX. (B) (R)-NPX.

with those previously described.¹⁶ ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, δ): 30.3, 35.4, 123.3, 125.1, 129.1, 130.8, 131.8, 141.1, 179.1.

N-[1-(*S*)-(1-Naphthylethyl)-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]propanamide]¹⁶. Thionyl chloride (0.2 mL, 2.56 mmol) was added dropwise to a solution of 3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]propanoic acid (373 mg, 1.71 mmol) in anhydrous toluene (20 mL) at room temperature under nitrogen. The reaction mixture was heated at 75 °C under anaerobic conditions for 2 h. Upon completion of the reaction, the solvent was removed by distillation under reduced pressure to get a residue, which was used as such in the next step, redissolved in methylene chloride (20 mL). This solution was added dropwise to a stirred solution of (*S*)-1-(1-naphthyl)ethylamine (0.2 mL, 1.27 mmol) and triethylamine (0.7 mL, 5.13 mmol) in methylene chloride (20 mL), cooled at 0 °C and under nitrogen atmosphere. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature, and then, water (15 mL) was added. The organic layer was washed with sodium bicarbonate (3×15 mL) and 1 M hydrochloric acid (3×15 mL) in order to remove residual starting materials. Then, it was washed again with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and evaporated under reduced pressure to get a white solid residue, which was recrystallized from a mixture of hexane (2 mL) and ethyl acetate (3 mL) to give the corresponding amide (285 mg, 61%). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ): 1.62 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 2.48 (m, 2H), 3.07 (m, 2H), 5.58 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.94 (m, 1H), 7.32–8.10 (m, 11H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, δ): 20.6, 31.3, 38.0, 44.7, 122.5, 123.1, 123.3, 125.0, 125.2, 125.9, 126.6, 128.4, 128.8, 128.9, 130.6, 131.1, 132.0, 134.0, 138.0, 141.7, 170.3.

(*S*)-Cinacalcet *N*-(1*S*)-1-naphthylethyl-*N*-[3-(3-trifluoromethylphenyl)propyl] amine). (*S*)-Cinacalcet was prepared by reduction of *N*-[1-(*S*)-(1-naphthylethyl)-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]propanamide. The amide (250 mg, 0.67 mmol) was dissolved in dry tetrahydrofuran (30 mL), and the solution was maintained at 0 °C. Then, 1.3 mL (2.69 mmol) of 2 M LiAlH_4 in tetrahydrofuran was added dropwise, and the mixture was heated under reflux for 4 h. The reaction mixture was cooled to room temperature, and then, it was filtered through a pad of Celite. The solid was washed with ethyl acetate, and the resulting filtrate was distilled under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (eluent: methylene chloride/methanol/ NH_4OH 98:2:0.1) to get (*S*)-cinacalcet (166 mg, 64%) as a yellowish oil. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ): 1.40 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 1.73 (quint, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.55 (m, 4H), 4.52 (q, $J = 6.4$ Hz, 1H), 7.16–7.45 (m, 7H), 7.55 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.77 (dd, $J = 7.2$ and 2.4 Hz, 1H), 8.09 (dd, $J = 9.3$ and 1.5 Hz, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, δ): 23.5, 31.9, 33.5, 47.4, 53.8, 122.7, 122.8, 123.0, 125.1, 125.4, 125.7, 125.8, 127.2, 128.7, 129.0, 130.6, 131.4, 131.8, 134.0, 141.2, 143.1. Exact mass: m/z found 358.1779, calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NF}$ (MH^+) 358.1783.

Laser Flash Photolysis. Experimental details for a typical determination of binding degree for a drug/protein 1:1 mixture follows. To 1600 μL of a 2×10^{-4} M solution of drug in PBS, 400 μL of protein 10^{-3} M in PBS was added. Then, the resulting solution (2 mL) was placed in a quartz cuvette and submitted to laser flash photolysis. In general, samples received between 5 and 10 pulses for all of the kinetic experiments. This light dose did not result in any detectable decomposition of the sample, as revealed by UV-vis absorption measurements prior to and after photolysis. For the systems containing drug/SA/AAG at a 1:0.5:0.5 molar ratio, solutions were prepared as follows. To 1600 μL of a 2×10^{-4} M solution of drug in PBS, 200 μL of SA 1×10^{-3} M in PBS and 200 μL of AAG 1×10^{-3} M in PBS were added. Solutions were incubated at 4 °C overnight in the dark before acquisition. Experiments were carried out with a pulsed XeCl excimer laser ($\lambda_{\text{exc}} = 308$ nm, ~ 17 ns pulse width, < 100 mJ per pulse) or a Nd:YAG SL404G-10 Spectron Laser Systems ($\lambda_{\text{exc}} = 266$ nm, ~ 10 ns pulse width, ~ 10 mJ per pulse). A pulsed Lo255 Oriol xenon lamp was used as a detecting light source. The observation wavelength was selected with a 77200 Oriol monochromator, and the signal was amplified by an Oriol

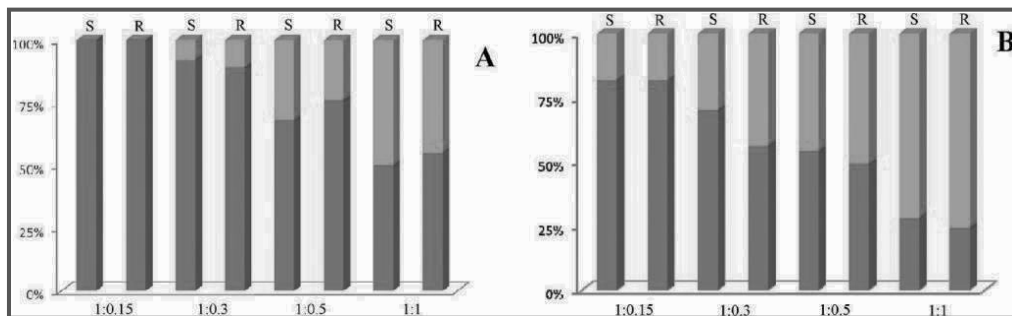


Figure 5. Percentage of free (S)- and (R)-PPN (blue) and AAG bound (orange) at different PPN/HAAG (A) or PPN/BAAG (B) molar ratios.

Table 3. Triplet Lifetimes and Percentages of (S)- and (R)-PPN Bound to HAAG and BAAG Determined by LFP at a 1:1 Drug/Protein Molar Ratio

	protein	τ_B (μ s)	% PPN bound
(S)-PPN	HAAG	43.2	50
(S)-PPN	BAAG	46.5	72
(R)-PPN	HAAG	45.5	45
(R)-PPN	BAAG	45.6	76

photomultiplier tube (PMT) system made up of a 77348 side-on tube, 70680 housing, and a 70705 power supply. The signal was registered with a TDS-640A Tektronix oscilloscope and subsequently transferred to a personal computer. All experiments were done in $10 \times 10 \text{ mm}^2$ quartz cells with 4 mL capacity under air atmosphere.

RESULTS AND DISCUSSION

Application of the LFP-based methodology is based on a significant discrimination between the triplet lifetimes of the drug within the protein binding sites. Prior to investigation of the binary systems, it was necessary to determine the drug triplet lifetimes in PBS, SA, and AAG separately. Then, fitting of the triplet decay traces in the SA/AAG systems, using the τ_T values obtained in each media, provided the pre-exponential factors leading to drug distribution. The results obtained for NPX, PPN, and CIN under different conditions are reported below.

Binding of naproxen to proteins. Upon LFP of (S)- or (R)-NPX at 308 nm in PBS, a complex transient spectrum was observed, with the main maximum at 440 nm, corresponding to the T–T absorption ($^3\text{NPX}^*$) and a weaker band in the range of 550–650 nm, corresponding to the radical cation^{15a} (Figure 1A, inset). Under aerobic conditions, the lifetime (τ_T) was found to be 1.8 μ s. In the presence of different amounts of HSA or BSA, only the $^3\text{NPX}^*$ band was observed; the decays at 440 nm (Figure 1B) did not follow a simple monoexponential law and took place at longer time scales. At a 1:1 molar ratio, a satisfactory fitting was obtained by considering two monoexponential terms (eq 1).

$$\Delta(\text{OD}) = \Delta(\text{OD})_0 + A_I e^{-t/\tau_I} + A_{II} e^{-t/\tau_{II}} \quad (1)$$

where τ_I and τ_{II} correspond to NPX within sites I and II, respectively. At higher drug/protein ratios, three lifetime values

were necessary to obtain a good fitting of the decay signal (eq 2).

$$\Delta\text{OD} = \Delta(\text{OD})_0 + A_F e^{-t/\tau_F} + A_I e^{-t/\tau_I} + A_{II} e^{-t/\tau_{II}} \quad (2)$$

This can be ascribed to the presence of the two long-lived NPX@HSA species, in addition to free NPX. Regression analysis of the decay curves for NPX/SA ratios from 1:0.15 to 1:1 allowed us to determine the values of the A_F , A_I , and A_{II} coefficients, corresponding to free, site-I-bound, and site-II-bound drugs. Table 1 summarizes the triplet lifetimes found for the different NPX/SA combinations, whereas Figure 2 shows the NPX distribution at several drug/protein molar ratios.

A different behavior was observed in the presence of AAGs, where the binding degree was markedly lower. Thus, with equimolar amounts of proteins, two triplet lifetimes were found (eq 3), corresponding to free (τ_F) and bound (τ_B) drug.

$$\Delta\text{OD} = \Delta(\text{OD})_0 + A_F e^{-t/\tau_F} + A_B e^{-t/\tau_B} \quad (3)$$

Again, regression analysis of the decay curves for NPX/AAGs allowed us to determine the corresponding pre-exponential factors A_F and A_B . The most relevant parameters obtained for different NPX/AAG combinations are given in Table 2; they reveal a remarkable species dependence for both NPX enantiomers, with a clearly higher binding capability displayed by the bovine protein.

After studying the binding of NPX to SAs and AAGs separately, the situation in binary systems containing simultaneously both proteins was investigated. Thus, NPX/SA/AAG mixtures (molar ratio 1:0.5:0.5) were submitted to LFP at $\lambda_{\text{exc}} = 308 \text{ nm}$, and the decays at $\lambda = 440 \text{ nm}$ were analyzed by means of eq 4.

$$\Delta\text{OD} = \Delta(\text{OD})_0 + A_F e^{-t/\tau_F} + A_B e^{-t/\tau_B} + A_I e^{-t/\tau_I} + A_{II} e^{-t/\tau_{II}} \quad (4)$$

where τ_F , τ_B , τ_I , and τ_{II} correspond to the triplet species in the bulk solution, bound to AAG, or within site I and site II of SA, respectively.

In the case of the human proteins, the decays recorded for (S)- and (R)-NPX are shown in Figure 3. Due to the much higher affinity of both enantiomers to albumin, the traces obtained for binary systems resulted in being very similar to those of NPX/HSA mixtures. Thus, the presence of HAAG does not affect the decay kinetics of HSA-bound drug, revealing the lack of protein–protein interactions. Application of eq 4 confirmed that the amount of drug bound to HAAG was nearly negligible.

Interestingly, a different situation was observed with the bovine proteins. Assuming that the A_I/A_{II} ratios found in the 1:0.5 NPX/BSA

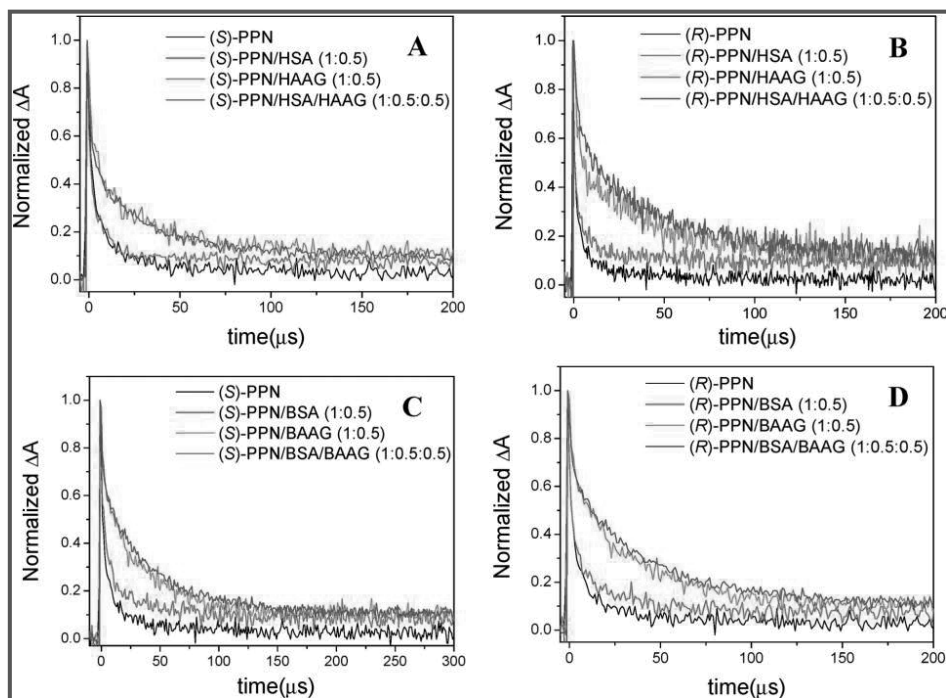


Figure 6. Decays for PPN (2×10^{-4} M, PBS 0.01 M, pH = 7.4, $\lambda_{\text{exc}} = 308$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 420$ nm, air); PPN/no protein (black), PPN/SA (red), PPN/AAG (green), and PPN/SA/AAG (blue). (A) (S)-PPN/Human proteins. (B) (R)-PPN/human proteins. (C) (S)-PPN/bovine proteins. (D) (R)-PPN/bovine proteins.

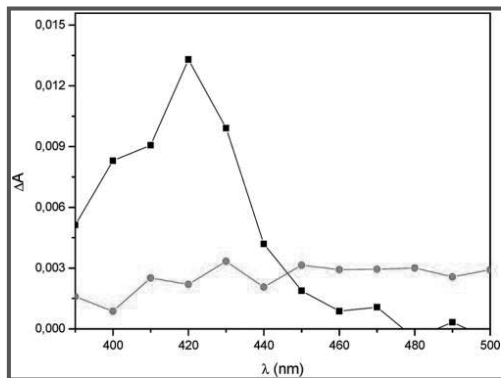


Figure 7. Transient absorption spectra ($\lambda_{\text{exc}} = 266$ nm, PBS, air) of (S)-CIN (10^{-4} M) (■) and HSA (5×10^{-5} M) (●) recorded 0.5 μ s after the laser pulse.

mixtures remain constant and fixing the triplet lifetimes to the values determined in separate NPX/BAAG and NPX/BSA experiments, application of eq 4 for fitting the decay traces led to the percentages of NPX within each protein environment and the bulk solution. The results are displayed in Figure 4. They show that BSA is the major

Table 4. Triplet Lifetimes of (S)- and (R)-CIN Bound to SAs or AAGs Determined on LFP Experiments (at a 1:1 Drug/Protein Molar Ratio)

drug	protein	τ_I (μ s)	τ_{II} (μ s)	protein	τ_B (μ s)
(S)-CIN	HSA	6.8	36.3	HAAG	15.0
(S)-CIN	BSA	7.0	58.0	BAAG	20.0
(R)-CIN	HSA	5.0	30.1	HAAG	21.0
(R)-CIN	BSA	7.1	65.4	BAAG	30.0

transport protein for NPX, although BAAG competes to some extent when both proteins are present in the medium.

Binding of PPN to Proteins. The behavior of PPN in the presence of SAs and AAGs was also investigated, following the same methodology as in the case of NPX. However, PPN binding to these transport proteins revealed particular features. Thus, upon LFP of (S)- or (R)-PPN at 308 nm, a transient spectrum with a maximum at 420 nm was observed, which was due to the $^3\text{PPN}^*$ absorption together with that corresponding to the PPN radical cation. Under aerobic conditions, τ_T was 1.9 μ s and $\tau_{RC} = 13.5$ μ s. Interestingly, the PPN decays monitored at 420 nm, both in the presence and in the absence of SAs, were almost coincident. This indicates that binding of PPN to these proteins is almost negligible, even at high drug/SAs ratios.

By contrast, in the presence of AAGs, the kinetics were markedly different. The decay traces lengthened and required a

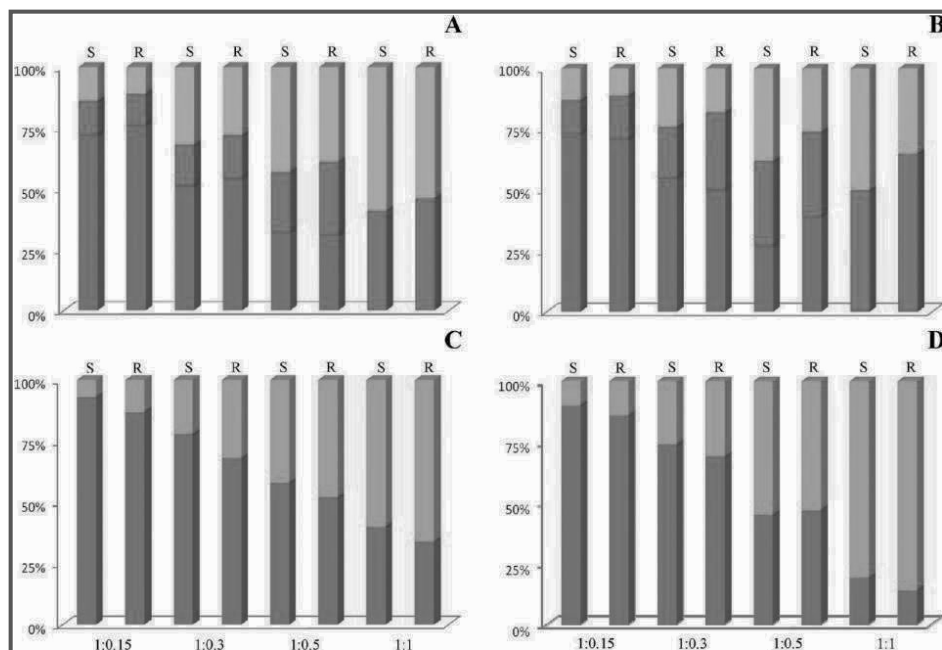


Figure 8. Percentage of (S)- or (R)-CIN free (blue), site-I-bound (red), and site II-bound (green) at different CIN/HSA (A) or CIN/BSA (B) molar ratios. Percentage of (S)- or (R)-CIN free (blue) and bound (orange) at different CIN/HAAG (C) or CIN/BAAG (D) molar ratios.

function (eq 5) containing three monoexponential terms for a satisfactory fitting, corresponding to two free species (triplet and radical cation) plus the longer-lived protein-bound triplet.

$$\Delta OD = \Delta(OD)_0 + A_{Fe} e^{-t/\tau_F} + A_{RC} e^{-t/\tau_{RC}} + A_B e^{-t/\tau_B} \quad (5)$$

Regression analysis of the decay curves for different PPN/AAGs mixtures allowed us to determine the preexponential factors and then the amount of free and bound PPN (Figure 5). The most relevant parameters obtained for different PPN/AAG combinations are given in Table 3; again, a remarkable species dependence was observed for both PPN enantiomers, with a clearly higher binding capability in the case of the bovine protein.

After studying the binding of PPN to SAs and AAGs separately, the situation in binary systems containing simultaneously both proteins was investigated.

Thus, PPN/SA/AAG mixtures (molar ratio 1:0.5:0.5) were submitted to LFP at $\lambda_{exc} = 308$ nm and the decays at $\lambda = 420$ nm monitored. The traces recorded for (S)- and (R)-PPN under different conditions are shown in Figure 6. Due to the much higher affinity of both enantiomers to AAGs, the traces obtained for binary systems resulted in being very similar to those of PPN/AAG mixtures. Furthermore, the presence of HSA does not affect the decay kinetics of HAAG-bound drug, revealing again the lack of protein–protein interactions. The obtained results confirmed that, in the binary protein systems, the amount of drug bound to SAs was almost negligible.

Binding of Cinacalcet to Proteins. The (S)-enantiomer of CIN was not commercially available; therefore, it was prepared following the procedure depicted in Scheme 1.¹⁶

Due to solubility limitations, the LFP experiments with CIN were performed at 266 nm. Thus, after excitation, a transient spectrum with a maximum at 420 nm was observed, corresponding to the T–T absorption;¹⁴ its lifetime (τ_T), under air, was found to be 1.9 μ s. Upon addition of different amounts of SAs or AAGs, the ³CIN* band was still observed, but it disappeared with a markedly slower kinetics. Because both drug and protein are excited under these conditions, a possible interference due to Trp should be ruled out. Actually, no protein-to-drug singlet–singlet energy transfer has been previously observed in CIN@HSA complexes by means of fluorescence spectroscopy.¹⁴ Regarding the triplet behavior, Figure 7 shows the transient absorption spectra of CIN and HSA; they clearly demonstrate that the protein alone does not give rise to any detectable species that could interfere with the T–T band of CIN under the employed experimental conditions.

Treatment of the decays by means of eqs 2 (SAs) or 3 (AAGs), as stated above for NPX, led to determination of the key parameters (Table 4) and the percentage of CIN in the different compartments (Figure 8).

Site assignment in the SAs was achieved using the established methodology based on displacement probes (warfarin for site I and ibuprofen for site II).¹⁷

Interestingly, CIN showed a significant affinity to both types of transport proteins; therefore, it was found to be the most suitable probe for investigating its behavior in binary SA/AAG systems. For this purpose, CIN/SA/AAG mixtures (1:0.5:0.5 molar ratio) were submitted to LFP at $\lambda_{exc} = 266$ nm, and the decays at $\lambda = 420$ nm (Figure 9) were analyzed by means of eq 4.

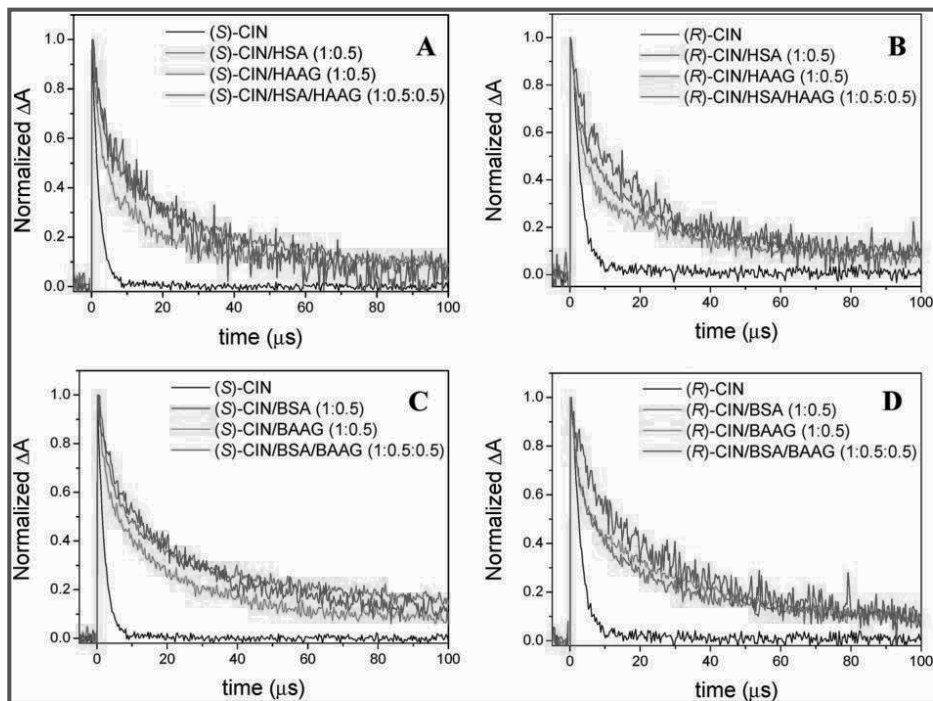


Figure 9. Decays for CIN (10^{-4} M, PBS 0.01 M, pH = 7.4, $\lambda_{\text{exc}} = 266$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 420$ nm, air). (A) (S)-CIN in the presence of human proteins. (B) (R)-CIN in the presence of human proteins. (C) (S)-CIN in the presence of bovine proteins. (D) (R)-CIN in the presence of bovine proteins.

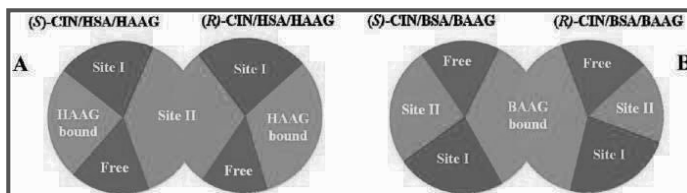


Figure 10. CIN distribution in binary SA/AAG systems at 1:0.5:0.5 molar ratios: free CIN (blue); AAG-bound (orange); site-I-bound (red); site-II-bound (green). (A) Human proteins. (B) Bovine proteins.

Assuming that the $A_{\text{I}}/A_{\text{II}}$ ratios found in the 1:0.5 CIN/SA mixtures remain constant and fixing the triplet lifetimes to the values determined in separate CIN/AAG and CIN/SA experiments, fitting of the decay traces, allowed us to obtain A_{F} , A_{B} , A_{I} , and A_{II} and hence the CIN distribution within each protein and the bulk solution. The results are displayed in Figure 10. They show that SA and AAG compete for CIN binding when both proteins are present in the same medium.

CONCLUSIONS

Transient absorption spectroscopy has proven to be a useful methodology for fast and consistent assessment of drug distribution in binary systems where two different proteins, serum albumins and α -1-acid glycoproteins, are present simultaneously. In this work, the

naphthalene chromophore has been used as the reporter. The procedure relies on determination of the percentages of drug in the different microenvironments from the relative contributions of the triplet lifetimes obtained by LFP upon fitting of the decay curves in the presence of SA/AAG binary mixtures. The three drugs examined (naproxen, propranolol, and cinacalcet) share a common NP chromophore but exhibit a clearly different binding behavior; while NPX binds preferentially to SA, PPN exhibits higher affinity for AAG than for SA, and CIN binds efficiently to both proteins.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: mcjimene@qim.upv.es (M.C.J.); mmiranda@qim.upv.es (M.A.M.). Phone: +34963877344. Fax: +34963879349.

■ ACKNOWLEDGMENT

Financial support from the MICINN (Grants CTQ2007-67010 and CTQ2010-14882), from the Generalitat Valenciana (Prometeo Program, Ref 2008/090), from Fundación Cajamurcia, and from Carlos III Institute of Health (Grant RIRAAF, RETICS program) is gratefully acknowledged.

■ REFERENCES

- (1) He, X. M.; Carter, D. C. *Nature* **1992**, *358*, 209.
- (2) (a) Jia, Z.; Ramstad, T.; Zhong, M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *405*, 413. (b) Lucas, L. H.; Price, K. E.; Larive, C. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14258. (c) Zini, R.; Morin, D.; Jouenne, P.; Tillement, J. P. *Life Sci.* **1988**, *43*, 2103. (d) Barne, J.; Chamouard, J. M.; Houin, G.; Tillement, J. P. *Clin. Chem.* **1985**, *31*, 60. (e) Bowers, W. F.; Fulton, S.; Thompson, J. *Clin. Pharmacokinet.* **1984**, *9*, 49. (f) Aki, H.; Yamamoto, M. *J. Pharm. Pharmacol.* **1989**, *41*, 674. (g) Parikh, H. H.; McElwaine, K.; Balasubramanian, V.; Leung, W.; Won, D.; Morris, M. E.; Ramanathan, M. *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 632. (h) Frostell-Karlsson, A.; Remaeus, A.; Roos, H.; Andersson, K.; Borg, P.; Hämäläinen, M.; Karlsson, R. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1986. (i) Shibukawa, A.; Kuroda, Y.; Nakagawa, T. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *18*, 1047. (j) Chu, Y. H.; Avila, L. Z.; Biebuyck, H. A.; Whitesides, G. M. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2915. (k) Wei, Y.; Dong, C.; Liu, D.; Shuang, S.; Huie, C. W. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 761.
- (3) Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N. *Mol. Pharmacol.* **1976**, *12*, 1052.
- (4) Peters, T. *All About Albumin; Biochemistry, Genetics and Medical Applications*; Academic Press: New York, 1995.
- (5) (a) Schmid, K.; Nimberg, R. B.; Kimura, A.; Yamaguchi, H.; Binette, J. P. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *492*, 291. (b) Schmid, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 60. (c) Hochepped, T.; Berger, F. G.; Baumann, H.; Libert, C. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2003**, *14*, 25. (d) Rojo-Dominguez, A.; Hernandez-Arana, A. *Protein Sequences Data Anal.* **1993**, *5*, 349. (e) Kopecky, V., Jr.; Ettrich, R.; Hofbauerova, K.; Baumruk, V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *300*, 41. (f) Aubert, J. P.; Loucheux-Lefebvre, M. H. *Arch. Biochem. Biophys.* **1976**, *175*, 400. (g) Friedman, M. L.; Wermeling, J. R.; Halsall, H. B. *Biochem. J.* **1986**, *236*, 149. (h) Kopitar, V. Z.; Weisenberger, H. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* **1971**, *21*, 859. (i) Schmid, K.; Kaufman, H.; Isemura, S.; Bauer, F.; Emura, J.; Motoyama, T.; Ishiguro, M.; Nanno, S. *Biochemistry* **1973**, *12*, 2711. (j) Schmid, K.; Nimberg, R. B.; Kimura, A.; Yamaguchi, H.; Binette, J. P. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *492*, 291. (k) Schmid, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 60.
- (6) Matsumoto, K.; Sukimoto, K.; Nishi, K.; Maruyama, T.; Suenaga, A.; Otagiri, M. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2002**, *17*, 300.
- (7) Schmid, K. In *The Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control*, 2nd ed.; Putnam, F. W., Ed.; Academic Press: New York, 1975; Vol I; pp 183–228.
- (8) (a) Vaya, I.; Bueno, C. J.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1015. (b) Jimenez, M. C.; Miranda, M. A.; Vaya, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10134. (c) Vaya, I.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 2694. (d) Lhiaubet-Vallet, V.; Miranda, M. A.; Bosca, F. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 423. (e) Lhiaubet-Vallet, V.; Sarabia, Z.; Bosca, F.; Miranda, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9538.
- (9) (a) Vaya, I.; Bueno, C. J.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *Chem.—Eur. J.* **2008**, *14*, 11284. (b) Bueno, C. J.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6861.
- (10) Perez-Ruiz, R.; Bueno, C. J.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 829.
- (11) (a) Sjöholm, I.; Ekman, B.; Kober, A.; Ljungstedt-Påhlman, I.; Seiving, B.; Sjödin, T. *Mol. Pharmacol.* **1979**, *16*, 767. (b) Kober, A.; Sjöholm, I. *Mol. Pharmacol.* **1980**, *18*, 421. (c) Honoré, B.; Brodersen, R. *Mol. Pharmacol.* **1984**, *25*, 137. (d) Banerjee, T.; Singh, S. K.; Kishore, N. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 24147. (e) Lejon, S.; Cramer, J. F.; Nordberg, P. *Acta Crystallogr.* **2008**, *F64*, 64. (f) Vera-Avila, L. E.; García-Salgado, E.; García de Llasera, M. P.; Peña-Alvarez, A. *Anal. Biochem.* **2008**, *373*, 272. (g) Gonzalez-Bejar, M.; Alarcon, E.; Poblete, H.; Scaiano, J. C.; Pérez-Prieto, J. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2255.
- (12) Jia, Z.; Ramstad, T.; Zhong, M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *30*, 405.
- (13) Mallik, R.; Xuan, H.; Guiochon, G.; Hage, D. S. *Anal. Biochem.* **2008**, *376*, 154 and references therein.
- (14) Nuin, E.; Andreu, I.; Torres, M. J.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 1158.
- (15) (a) Jiménez, M. C.; Pischel, U.; Miranda, M. A. *J. Photochem. Photobiol., C* **2007**, *8*, 128. (b) Sortino, S.; Petralia, S.; Bosca, F.; Miranda, M. A. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 136.
- (16) Bijukumar, G.; Maloyesh, B.; Bhaskar, B. S.; Rajendra, A. *Synth. Commun.* **2008**, *38*, 1512.
- (17) (a) Fehske, K. J.; Müller, K. J.; Schläfer, U.; Wollert, U. *Prog. Drug Protein Binding* **1981**, *2*, 5. (b) Itoh, T.; Saura, Y.; Tsuda, Y.; Yamada, H. *Chirality* **1997**, *9*, 643.

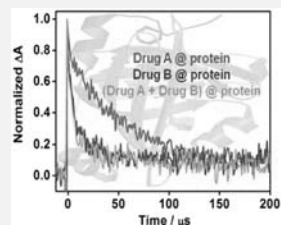
Drug–Drug Interactions within Protein Cavities Probed by Triplet–Triplet Energy Transfer

Eduarne Nuin,[†] M. Consuelo Jiménez,[†] Germán Sastre,[†] Inmaculada Andreu,^{*,‡} and Miguel A. Miranda^{*,†}[†]Departamento de Química-Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, Valencia, Spain[‡]Unidad mixta de investigación IIS La Fe-UPV, Hospital La Fe, Avda. Campanar 21, 46009 Valencia, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: A new direct and noninvasive methodology based on transient absorption spectroscopy has been developed to probe the feasibility of drug–drug interactions within a common protein binding site. The simultaneous presence of (*R*)-cinacalcet (CIN) and (*S*)-propranolol (PPN) within human or bovine α_1 -acid glycoproteins (AAGs) is revealed by detection of $^3\text{CIN}^*$ as the only transient species after laser flash photolysis of CIN/PPN/AAG mixtures at 308 nm. This is the result of triplet–triplet energy transfer from $^3\text{PPN}^*$ to CIN, which requires close contact between the two drugs within the same biological compartment. Similar results are obtained with nabumetone and CIN as donor/acceptor partners. This new methodology can, in principle, be extended to a variety of drug/drug/biomolecule combinations.

SECTION: Biophysical Chemistry and Biomolecules



The phenomenon of drug–drug interactions (DDI) is becoming a common issue in modern medicine and drug development. It is defined as a set of measurable modifications of the action of one drug by prior or concomitant coadministration of another drug.^{1–4} The outcome of such interactions includes beneficial effects (i.e., additive and potentiating) but also undesired side effects, such as loss of therapeutic properties or toxicity. For instance, DDI are the origin of many hospital admissions, as they may be associated with severe or even fatal medical episodes.⁵ As a result, a number of established drugs have been withdrawn from the market after discovering their involvement in medically important, unwanted DDI. In general, DDI may become of special relevance in high-risk patients receiving multiple drug therapy (polypharmacy), a common situation in the elderly.⁶ It is clear that a scientifically sound understanding of the potential for DDI should be required before introducing new chemical entities.^{7–9}

The mechanism of DDI is currently a matter of intensive research activity. It may involve pharmacokinetic interactions, which affect absorption, distribution, biotransformation, and excretion of the drugs.^{10–12} A key factor in pharmacokinetics is plasma protein binding, where DDI may play a clinically significant role by affecting the blood drug concentration. Interactions at the transport protein level may lead to altered drug distribution to the target organs via displacement from the protein binding sites.^{13,14} Hence, the possibility of two drugs sharing the same protein binding site should be considered in the case of tightly bound drugs having a narrow therapeutic window.

Detection of DDI is not straightforward, especially if looking at direct, noninvasive *in situ* determinations. The employed *in*

vitro methods include assays with cells or artificial membranes as well as physical measurements based on nuclear magnetic resonance or fluorescence spectroscopy, among others.^{3,4} Specifically, the well-known Förster resonance energy transfer (FRET) involves singlet–singlet energy transfer, which occurs by dipole–dipole interaction and can operate at long distances between chromophores located in different biological compartments.^{15,16} Hence, the development of complementary strategies for assessment of DDI within the same protein binding sites is an important field of interest that requires further research effort.¹⁷

In this context, the behavior of triplet excited states is highly sensitive to the microenvironment, a property that has been exploited to address a number of biologically relevant problems. In particular, laser flash photolysis (LFP) of drug@protein systems has allowed us to obtain a wealth of information on the binding of flurbiprofen, its methyl ester, carprofen, naproxen, propranolol, or cinacalcet to a transport protein, that is, human or bovine serum albumins (HSA, BSA) or α_1 -acid glycoproteins (HAAG, BAAG).^{18–27} With this background, it appeared interesting to explore the potential of triplet excited states as reporters for intraprotein DDI detection. In the case of two different drugs sharing a common binding site, triplet–triplet energy transfer (TTET) could be revealed by transient absorption spectroscopy, as this phenomenon occurs exclusively through a Dexter mechanism, which requires electron

Received: March 22, 2013

Accepted: April 23, 2013

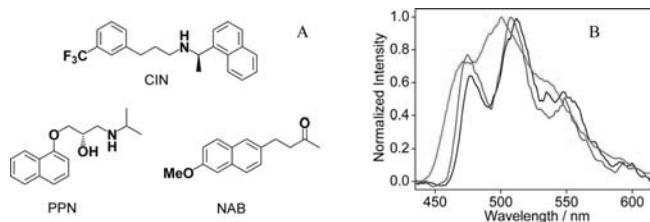


Figure 1. (A) Chemical structures of CIN, PPN, and NAB. (B) Normalized phosphorescence spectra of CIN (black), PPN (blue), and NAB (red) in ethanol matrix at 77 K. The absorbance of the samples was 0.8 at the excitation wavelength (308 nm).

exchange and therefore a close contact between the donor and acceptor partners.

To prove the concept, we have chosen HAAG and BAAG as biological hosts due to their ability to bind and transport endogenous or exogenous ligands, mainly with basic or neutral character. These proteins consist of one polypeptide chain and are highly glycosylated. Although several binding sites have been described for AAGs, most drugs and small organic molecules bind almost exclusively to one of them, which is large and flexible. The other binding sites have much lower importance; therefore, their role in the transport of substrates is marginal.^{28–35} The hydrophobic nature of the binding pockets of HAAG and BAAG is similar, although their microviscosities are markedly different.³⁶

The drugs selected for interrogation of DDI were (*R*)-cinacalcet (CIN), (*S*)-propranolol (PPN), and nabumetone (NAB); their chemical structures are shown in Figure 1A. They possess a naphthalene (NP) chromophore, appropriate for generation and detection of the triplet excited state. The different NP substitution was expected to modulate the position of the transient absorption maxima and the triplet energy values, thus making the TTET process possible and facilitating its monitoring by LFP.

CIN is a calcimimetic, prescribed for persistent hyperparathyroidism in renal transplanted patients; in blood, at therapeutic doses, it is found quantitatively bound to transport proteins.³⁷ PPN is a nonselective β -blocker used for the treatment of hypertension that binds strongly to HAAG ($K_B = 2\text{--}4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$).³⁸ Co-administration of CIN and PPN constitutes a real case of DDI,³⁹ whose most common side effects experienced by patients include anxiety, diarrhea, and asthenia. NAB is a nonsteroidal anti-inflammatory drug commonly used to treat pain and inflammation associated with arthritis.⁴⁰

To check the feasibility of TTET between the selected drugs, their phosphorescence spectra were recorded in ethanol matrix at 77 K. The triplet energy values determined therefrom were found to be 60.9, 61.4, and 62.9 kcal mol⁻¹ for CIN, PPN, and NAB, respectively. Thus, it should, in principle, be possible to observe TTET from PPN to CIN and from NAB to CIN.

Before studying the complex, three-component systems, we investigated the behavior of the separate drugs in the absence of protein under our experimental conditions, both in organic solution and in aqueous medium. LFP of deaerated MeCN solutions of CIN, PPN, and NAB ($5.8 \times 10^{-4} \text{ M}$, $\lambda_{\text{exc}} = 308 \text{ nm}$) allowed us to obtain their transient absorption spectra and triplet lifetimes (τ_T); the results were in agreement with literature data, when available.^{26,27,41} For CIN, the maximum was located at 420 nm ($\tau_T = 4.0 \mu\text{s}$), while for PPN and NAB it

was centered at 450 nm ($\tau_T = 6.1$ and $10.4 \mu\text{s}$, respectively). Under air, the triplet lifetimes were markedly shorter; in addition, the triplet decays under aerated conditions were much longer in the protein microenvironment (Table 1). Interest-

Table 1. Triplet Lifetimes of CIN, PPN, and NAB in Different Media

drug	τ_T (μs) ^a			
	MeCN/N ₂	MeCN/air	HAAG/air ^b	BAAG/air ^b
CIN	4.0	0.2	5.7	10.5
PPN	6.1	0.1	25.2	51.8
NAB	10.4	0.1	16.6	25.8

^aObtained upon LFP at $\lambda_{\text{exc}} = 308 \text{ nm}$. ^bDrug@protein systems at 1:1 molar ratio, in 0.01 M PBS.

ingly, both the position of the transient absorption maximum and the triplet lifetime of AAG-bound CIN were sufficiently different from those of PPN and NAB to monitor a possible TTET process.

After examining the individual AAG-bound drugs, we investigated the behavior of encapsulated donor/acceptor pairs to detect potential DDI. Attempts to dissolve CIN/PPN and CIN/NAB mixtures in PBS at the required concentrations failed, giving rise to turbid suspensions (Figure 2a,b). Complexation with AAGs was easily followed by the naked eye through a complete solubilization resulting in clear preparations (Figure 2c,d).

Remarkably, when a solution of CIN/PPN/HAAG at 1:1:1 molar ratio was submitted to LFP, the decay trace monitored at 450 nm matched that of the CIN/HAAG system (Figure 3A); a

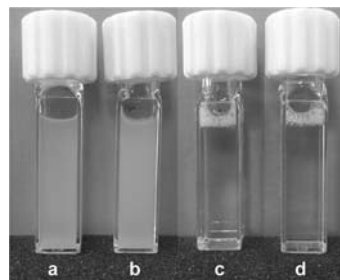


Figure 2. Photograph of drug mixtures in PBS in the absence and presence of protein: (a) CIN/PPN, (b) CIN/NAB, (c) CIN/PPN/HAAG, and (d) CIN/NAB/HAAG. Concentration of each component was $5.8 \times 10^{-4} \text{ M}$.

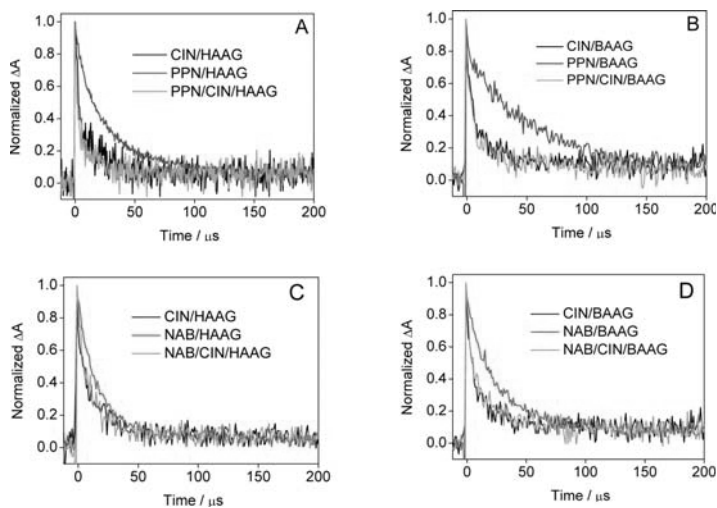
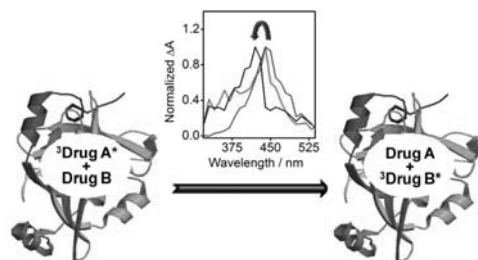


Figure 3. Laser flash photolysis ($\lambda_{exc} = 308$ nm, PBS/air) of CIN/PPN or NAB/AAG systems. Normalized decay traces monitored at $\lambda_{max} = 450$ nm for CIN/AAG (black), PPN/AAG (blue), NAB/AAG (red), CIN/PPN/AAG (orange), and CIN/NAB/AAG (green). (A,C) HAAG. (B,D) BAAG. The concentration of each component was 5.8×10^{-4} M.

similar situation was observed in the presence of BAAG (Figure 3B). No contribution from $^3\text{PPN}^*$ was observed in the kinetic decays. Likewise, for CIN/NAB/AAG solutions, the decay traces at 450 nm matched those of the CIN/AAG mixtures (Figures 3C,D). Accordingly, the transient absorption spectra obtained for the drug mixtures inside the proteins were identical to those of encapsulated CIN (Scheme 1). These results clearly indicated an efficient energy transfer from $^3\text{PPN}^*$ or $^3\text{NAB}^*$ to CIN and revealed the DDI between both pairs of drugs, which share a common AAG binding site.

Because the TTET process was completed within the duration of the laser pulse (<20 ns), deactivation of the excited triplet states has to be extremely fast, with a rate constant higher than 5×10^7 s $^{-1}$. Such a high value is not compatible with the expectedly slow diffusion inside the AAG binding sites and points to the formation of preassociated complexes

Scheme 1. Representation of the Use of TTET to Detect DDI between Two Drugs Sharing a Common Protein Binding Site



Drug A = (S)-PPN or NAB.

Drug B = (R)-CIN.

between donor (PPN or NAB) and acceptor (CIN). This was confirmed by theoretical calculations, which were performed to find the binding site of CIN and PPN at HAAG by means of a combined atomistic and quantum-semiempirical methodology, taking the HAAG structure (2868 atoms) from a recent determination.⁴² Attractive energetic interactions were found between CIN and PPN (-14 kJ/mol) and between HAAG and the associated drugs CIN+PPN (-46 kJ/mol), indicating that this protein can successfully host DDI, owing to the large size of the binding site and its intrinsic flexibility. The extra stabilization associated with pairing of PPN and CIN inside the protein would explain the lack of $^3\text{PPN}^*$ detection that could arise from two PPN molecules sharing the same binding site. Within the found equilibrium conformation (Figure 4), a more sophisticated DFT method using the accurate functional M06-2X and the large basis set Def2-TZVP revealed that TTET from PPN to CIN is indeed possible due to the large overlap between the relevant molecular orbitals and the small energy gap between them. Further details can be found in the Supporting Information.

In summary, the feasibility of DDIs within the binding sites of transport proteins can be probed by transient absorption spectroscopy. The concept involves detection of TTET, which requires a close proximity between the donor and acceptor partners and can only occur within a common biological compartment (Scheme 1). This constitutes a new methodology, which can, in principle, be extended to a variety of drug/drug/biomolecule combinations.

METHODS

Materials and Solvents. HAAG (99%), BAAG (99%), NAB, and PPN were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), whereas CIN hydrochloride was extracted from commercial Mimpara 60 mg (Amgen, Spain). The pills were powdered in a mortar, suspended in 1 M NH_4OH , and extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were

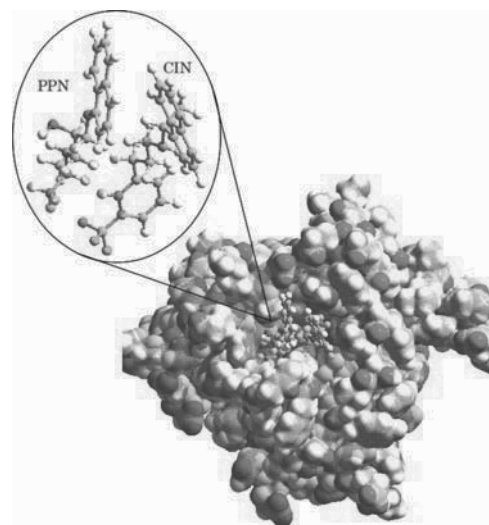


Figure 4. Optimized geometry of PPN and CIN within the binding site of HAAG.

washed with brine and water, dried over MgSO_4 , and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography through silica gel 60 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/15\text{ M NH}_4\text{OH}$ 98:2:0.1 v/v/v) to give the corresponding CIN free base as a colorless oil. Phosphate-buffered saline solution (PBS, pH 7.4, 0.01 M) was prepared by dissolving Sigma tablets in the appropriate amount of deionized water.

Phosphorescence Measurements. Phosphorescence spectra were obtained from a Photon Technology International (PTI, TimeMaster TM-2/2003) spectrofluorometer equipped with a pulsed Xe lamp. The apparatus was operated in time-resolved mode, with a delay time of 0.5 ms. Compounds were dissolved in ethanol, placed in a quartz tube (5 mm of diameter), and cooled to 77 K. The absorbance of the samples was 0.8 at the excitation wavelength (308 nm).

Laser Flash Photolysis Experiments. LFP experiments were carried out with a pulsed XeCl excimer laser ($\lambda_{\text{exc}} = 308\text{ nm}$, ca. 17 ns pulse width, <100 mJ per pulse). In general, samples received between one and three pulses for all of the kinetic experiments. A pulsed Lo255 Oriol Xenon lamp was used as detecting light source. The observation wavelength was selected with a 77200 Oriol monochromator, and the signal was amplified by an Oriol photomultiplier tube (PMT) system made up of a 77348 side-on tube, 70680 housing, and a 70705 power supply. The signal was registered with a TDS-640A Tektronix oscilloscope and subsequently transferred to a personal computer. Experiments conducted in the presence of different proteins were performed in air-saturated PBS; solutions were incubated 24 h in the dark before acquisition, and the decay traces (at 450 nm) were fitted to mono-exponential functions to determine the triplet lifetimes. The concentrations of the samples were fixed at the arbitrary value of $5.8 \times 10^{-4}\text{ M}$. All measurements were recorded at room temperature using $10 \times 10\text{ mm}^2$ quartz cells with 4 mL capacity.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Theoretical calculations on the binding of PPN and CIN to HAAG. This material is available free of charge via the Internet <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: iandreur@qim.upv.es (I.A.); mmiranda@qim.upv.es (M.A.M.).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

Financial support from the Spanish Government (CTQ2009-13699, CTQ2010-14882) and from the Carlos III Institute of Health (Grant R1RAAF, RETICS program, and Miguel Servet Contract CP11/00154 for I.A.) is gratefully acknowledged.

■ REFERENCES

- Wang, B. *Drug-Drug Interactions in Pharmaceutical Development*; Li, A. P., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, 2008.
- Rodríguez, A. D. *Drug-Drug Interactions*, 2nd ed.; Drugs and the Pharmaceutical Sciences 178; Informa Healthcare: New York, 2008.
- Aszalos, A. Drug-Drug Interactions Affected by the Transporter Protein, P-Glycoprotein (ABCB1, MDR1) I. Preclinical Aspects. *Drug Discovery Today* **2007**, *12*, 833–837.
- Aszalos, A. Drug-Drug Interactions Affected by the Transporter Protein, P-Glycoprotein (ABCB1, MDR1) II. Clinical Aspects. *Drug Discovery Today* **2007**, *12*, 838–843.
- Dresser, G. K.; Bailey, D. G. A Basic Conceptual and Practical Overview of Interactions With Highly Prescribed Drugs. *Can. J. Clin. Pharmacol.* **2002**, *9*, 191–198.
- Ito, K.; Iwatsubo, T.; Kanamitsu, S.; Ueda, K.; Suzuki, H.; Sugiyama, Y. Prediction of Pharmacokinetic Alterations Caused by Drug-Drug Interactions: Metabolic Interaction in the Liver. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 387–410.
- Huang, J.; Niu, C.; Green, C. D.; Yang, L.; Mei, H.; Han, D. J. Systematic Prediction of Pharmacodynamic Drug-Drug Interactions through Protein-Protein-Interaction Network. *PLOS. Comput. Biol.* **2013**, *9*, 1–9.
- Xiao, X.; Min, J.; Wang, P. Predicting Ion Channel-Drug Interactions Based on Sequence-Derived Features and Functional Groups. *J. Bionanosci.* **2013**, *7*, 49–54.
- Malone, D. C.; Abarca, J.; Hansten, P. D.; Grizzle, A. J.; Armstrong, E. P.; Van Bergen, R. C.; Duncan-Edgar, B. S.; Solomon, S. L.; Lipton, R. B. Identification of Serious Drug-Drug Interactions: Results of the Partnership to Prevent Drug-Drug Interactions. *J. Am. Pharm. Assoc.* **2004**, *44*, 142–151.
- Hansten, P. D.; Horn, J. R.; Hazlet, T. K. ORCA: Operational Classification of Drug Interactions. *J. Am. Pharm. Assoc.* **2001**, *41*, 161–165.
- Breedveld, P.; Zelcer, N.; Plum, D.; Sönmez, O.; Tibben, M. M.; Beijnen, J. H.; Schinkel, A. H.; van Tellingen, O.; Borst, P.; Schellens, J. H. M. Mechanism of the Pharmacokinetic Interaction between Methotrexate and Benzimidazoles: Potential Role for Breast Cancer Resistance Protein in Clinical Drug-Drug Interactions. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 5804–5811.
- Shitara, Y.; Sato, H.; Sugiyama, Y. Evaluation of Drug-Drug Interaction in the Hepatobiliary and Renal Transport of Drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, *45*, 689–723.
- Ayrton, A.; Morgan, P. Role of Transport Proteins in Drug Absorption, Distribution and Excretion. *Xenobiotica* **2001**, *31*, 469–497.
- Isoherranen, N.; Hachad, H.; Yeung, C. K.; Levy, R. H. Qualitative Analysis of the Role of Metabolites in Inhibitory Drug-

Drug Interactions: Literature Evaluation Based on the Metabolism and Transport Drug Interaction Database. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 294–298.

(15) Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed.; Springer Science + Business Media, LLC: New York, 2006.

(16) Heverkerl, H.; Spielmann, T.; Chmyrov, A.; Widengren, J. Förster Resonance Energy Transfer beyond 10 nm: Exploiting the Triplet State Kinetics of Organic Fluorophores. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 13360–13370.

(17) Boulenc, X.; Barberan, O. Metabolic-Based Drug-Drug Interactions Prediction, Recent Approaches for Risk Assessment along Drug Development. *Drug Metab. Drug Interact.* **2011**, *26*, 147–168.

(18) Jiménez, M. C.; Miranda, M. A.; Tormos, R.; Vayá, I. Characterization of the Lowest Singlet and Triplet States of (S)-Flurbiprofen. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 1038–1041.

(19) Lhiaubet-Vallet, V.; Sarabia, Z.; Bosca, F.; Miranda, M. A. Human Serum Albumin-Mediated Stereodifferentiation in the Triplet State Behavior of (S)- and (R)-Carprofen. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9538–9539.

(20) Jiménez, M. C.; Miranda, M. A.; Vayá, I. Triplet Excited States as Chiral Reporters for the Binding of Drugs to Transport Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10134–10135.

(21) Vayá, I.; Bueno, C. J.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. Use of Triplet Excited States for the Study of Drug Binding to Human and Bovine Serum Albumins. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1015–1020.

(22) Lhiaubet-Vallet, V.; Bosca, F.; Miranda, M. A. Stereodifferentiating Drug-Biomolecule Interactions in the Triplet Excited State: Studies on Supramolecular Carprofen/Protein Systems and on carprofen-Tryptophan Model Dyads. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 423–431.

(23) Vayá, I.; Bueno, C. J.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. Transient Absorption Spectroscopy for Determining Multiple Site Occupancy in Drug-Protein Conjugates. A Comparison between Human and Bovine Serum Albumins using Flurbiprofen Methyl Ester as Probe. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 2694–2699.

(24) Vayá, I.; Bueno, C. J.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. Determination of Enantiomeric Compositions by Transient Absorption Spectroscopy using Proteins as Chiral Selectors. *Chem.—Eur. J.* **2008**, *14*, 11284–11287.

(25) Pérez-Ruiz, R.; Bueno, C. J.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *In situ* Transient Absorption Spectroscopy to Assess Competition between Serum Albumin and Alpha-1 Acid Glycoprotein for Drug Transport. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 829–833.

(26) Nuin, E.; Andreu, I.; Torres, M. J.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. Enhanced Photosafety of Cinacalcet upon Complexation with Serum Albumin. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 1158–1164.

(27) Pérez-Ruiz, R.; Alonso, R.; Nuin, E.; Andreu, I.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. The Naphthalene Triplet Excited State as Probe for the Assessment of Drug Distribution in Binary Protein Systems. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 4460–4468.

(28) Schmid, K.; Nimberg, R. B.; Kimura, A.; Yamaguchi, H.; Binette, J. P. The Carbohydrate Units of Human Plasma Alpha-1 Acid Glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *492*, 291–302.

(29) Schmid, K. Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. XXIX. Separation from Human Plasma of Polysaccharides, Peptides and Proteins of Low Molecular Weight. Crystallization of an Acid Glycoprotein. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 60–68.

(30) Hocheppied, T.; Berger, F. G.; Baumann, H.; Libert, C. α_1 -Acid Glycoprotein: An Acute Phase Protein with Inflammatory and Immunomodulating Properties. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2003**, *14*, 25–34.

(31) Rojo-Dominguez, A.; Hernandez-Arana, A. Three-Dimensional Modeling of the Protein Moiety of Human Alpha-1 Acid Glycoprotein, A Lipocalin-Family Member. *Protein Sequences Data Anal.* **1993**, *5*, 349–355.

(32) Kopecky, V., Jr.; Ettrich, R.; Hofbauerova, K.; Baumruk, V. Structure of Human α_1 -Acid Glycoprotein and Its High-Affinity Binding Site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *300*, 41–46.

(33) Aubert, J. P.; Loucheux-Lefebvre, M. H. Conformational Study of α_1 -Acid Glycoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.* **1976**, *175*, 400–409.

(34) Schmid, K.; Kaufman, H.; Isemura, S.; Bauer, F.; Emura, J.; Motoyama, T.; Ishiguro, M.; Nanno, S. Structure of α_1 -Acid Glycoprotein. Complete Amino Acid Sequence, Multiple Amino Acid Substitutions, and Homology with the Immunoglobulins. *Biochemistry* **1973**, *12*, 2711–2724.

(35) Nishi, K.; Sakai, N.; Komine, Y.; Maruyama, T.; Halsall, H. B.; Otigiri, M. Structural and Drug-Binding Properties of α_1 -Acid Glycoprotein in Reverse Micelles. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1601*, 185–191.

(36) Matsumoto, K.; Sukimoto, K.; Nishi, K.; Maruyama, T.; Suenaga, A.; Otigiri, M. Characterization of Ligand Binding Sites on the alpha-1-Acid Glycoprotein in Humans, Bovines and Dogs. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2002**, *17*, 300–306.

(37) Kumar, G. N.; Sproul, C.; Poppe, L.; Turner, S.; Gohdes, M.; Ghorobah, H.; Padhi, D.; Roskos, L. Metabolism and Disposition of Calcimimetic Agent Cinacalcet HCl in Humans and Animal Models. *Drug Metab. Dispos.* **2004**, *32*, 1491–1500.

(38) Mallik, R.; Xuan, H.; Guiochon, G.; Hage, D. S. Immobilization of α_1 -Acid Glycoprotein for Chromatographic Studies of Drug-Protein Binding II. Correction for Errors in Association Constant Measurements. *Anal. Biochem.* **2008**, *376*, 154–156.

(39) Block, G. A.; Zaun, D.; Smits, D.; Persky, M.; Brillhart, S.; Nieman, K.; Liu, J.; St. Peter, W. L. Cinacalcet Hydrochloride Treatment Significantly Improves All-Cause and Cardiovascular Survival in a Large Cohort of Hemodialysis Patients. *Kidney Int.* **2010**, *78*, 578–589.

(40) Lister, B. J.; Poland, M.; DeLapp, R. E. Efficacy of Nabumetone versus Diclofenac, Naproxen, Ibuprofen, and Piroxicam in Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis. *Am. J. Med.* **1993**, *95*, 2s–9s.

(41) Martinez, L. J.; Scaino, J. C. Characterization of the Transient Intermediates Generated from the Photoexcitation of Nabumetone: A Comparison with Naproxen. *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 646–651.

(42) Nishi, K.; Ono, T.; Nakamura, T.; Fukunaga, N.; Izumi, M.; Watanabe, H.; Suenaga, A.; Maruyama, T.; Yamagata, Y.; Curry, S.; Otigiri, M. Structural Insights into Differences in Drug-binding Selectivity between Two Forms of Human α_1 -Acid Glycoprotein Genetic Variants, the A and F1*S Forms. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 14427–14434.

Supporting Information for:

Drug-Drug Interactions within Protein Cavities Probed by Triplet-Triplet Energy Transfer

Edurne Nuin^a, M. Consuelo Jiménez^a, Germán Sastre^a, Inmaculada Andreu^{b} and Miguel A. Miranda^{a*}*

^aDepartamento de Química-Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, Valencia, Spain.

^bUnidad Mixta de investigación IIS La Fe-UPV, Hospital La Fe, Avda. Campanar 21, Valencia, Spain

S1: This page.

S2: Computational methods and results.

S5: Figure S1. Top: Geometry optimized model of HAAG (colored surface) containing CIN and PPN (smaller ball and stick). Bottom: the same model without the drugs (CIN, PPN), showing more clearly the cavity of the binding site.

S6: Figure S2. Molecular orbitals (MOs) involved in the electronic energy transfer from PPN(triplet) to CIN(ground state). **Top:** PPN triplet (donor) contains 71 α -electrons and 69 β -electrons, with the MO involved in the electron exchange being the SOMO (left). CIN ground state (acceptor) contains 94 α -electrons and 94 β -electrons, with the MO involved in the electron exchange being the LUMO (right). **Bottom:** SOMO-1 PPN triplet (left) and HOMO CIN (right).

S7: References.

Computational Methods and Results

The calculations have been performed using a combined set of three techniques aimed at finding the binding site of CIN and PPN at HAAG. The structure of HAAG (2868 atoms) has been taken from the recent determination by Nishi et al. [1].

In a first stage, a Monte-Carlo approach, using the GULP code [2], has been used in order to explore a large conformational space of binding sites of -separately- CIN and PPN at HAAG. Starting with experimental location of some drugs [1], a large area of the protein around those binding sites has been explored in order to find stable binding sites for CIN and PPN. As usually, the Monte-Carlo technique takes into account both the protein and the binding molecules as rigid bodies. Although this limits the calculation accuracy, it is convenient to save computer time and hence to explore many millions of random moves and to calculate their corresponding binding energies. The energy expression has been considered according to the Universal Force Field [3]. From all the configurations, those more energetically favorable have been selected for the next steps of the calculation.

In the second stage, a full lattice energy minimization technique [4,5] has been employed by optimizing all the atoms of the system using the Universal Force Field, with 1000 cycles of geometry optimization using a steepest descent algorithm. For this task the Avogadro software [6] has been used. The aim of this approach is to make a low level geometry optimization of the full system so that, in particular, the geometry of the binding site is optimized.

Finally, in the third stage, a quantum semiempirical PM7 [7] partial geometry optimization has been performed within the MOPAC2012 code [8]. This is a considerable step forward to improve the quality of the geometry optimization and to obtain a reliable atomic charge distribution of all the atoms of the system. In addition, this takes into account short and long range interactions with a quantum approach, much more accurate than the atomistic approaches. In this case, taking into account that the whole system includes more than 2000 atoms, a different approach for the geometry optimization has been considered. All atoms in the protein located at a distance shorter than a predefined threshold to any drug atom have been

marked for geometry optimization. Also, the atoms of the drugs (CIN and PPN) have been marked for optimization. After a given number of steps, the new list of 'close atoms' has been updated and a new set of geometry optimization cycles have been performed. In this way, a reliable final geometry has been obtained for HAAG, CIN and PPN, using a threshold distance of 8 Å and 300 cycles of geometry optimization.

The full approach of three stages can then be repeated or stopped as many times as needed until convergence of the results. The final geometry is shown in Figure S1. The quantum semiempirical PM7 results indicate a binding energy of -46.3 kJ/mol between the two associated drugs (CIN+PPN) and HAAG. This indicates that there is sufficient space on the protein binding site to accommodate both drugs. An analysis of the energetic interaction between CIN and PPN leads to the value of -14.2 kJ/mol, showing a favorable interaction between the two drugs. Both negative energies are required in order to explain the association of the two drugs in the binding site of HAAG.

After finding the geometry of CIN and PPN at HAAG, single point calculations have been performed by means of a DFT approach, using the hybrid M062X [9] functional and Def2-TZVP [10] basis set and the Gaussian09 code [11]. With this methodology, the energetic interaction between CIN and PPN gives -36.0 kJ/mol, confirming that there is a considerable association between the two drugs. With this first-principles method, and taking the previously optimized geometry of CIN and PPN at HAAG, we have calculated the feasibility of the energy transfer from the excited triplet of PPN to the ground state of CIN. This has been evaluated in terms of the overlap between the involved molecular orbitals and the corresponding energy difference. The M062X functional has been shown particularly accurate to describe the singlet to triplet electronic transitions [12].

With the single point geometry, the electronic structure (M062X/Def2-TZVP) of the PPN triplet and the CIN ground state have been optimized and then the molecular orbital energies and spatial distribution have been extracted. Two simultaneous electron exchanges have been considered for the TTET mechanism: from SOMO(PPN) to LUMO(CIN), and from HOMO(CIN) to SOMO-1(PPN).

A small energy difference, +0.109 eV, has been found between SOMO(PPN) and LUMO(CIN), with the former being higher in energy. Figure S2 (top) shows a massive overlap between SOMO(PPN) and LUMO(CIN). In the case of HOMO(CIN) and SOMO-1(PPN), the energy difference is even smaller, 0.013 eV, which favors the electronic exchange. Here, a massive overlap between the two orbitals has also been found (Figure S2, bottom). The feasibility of both electronic exchange steps demonstrates that a TTET mechanism is indeed possible between PPN(triplet) and CIN(ground state).

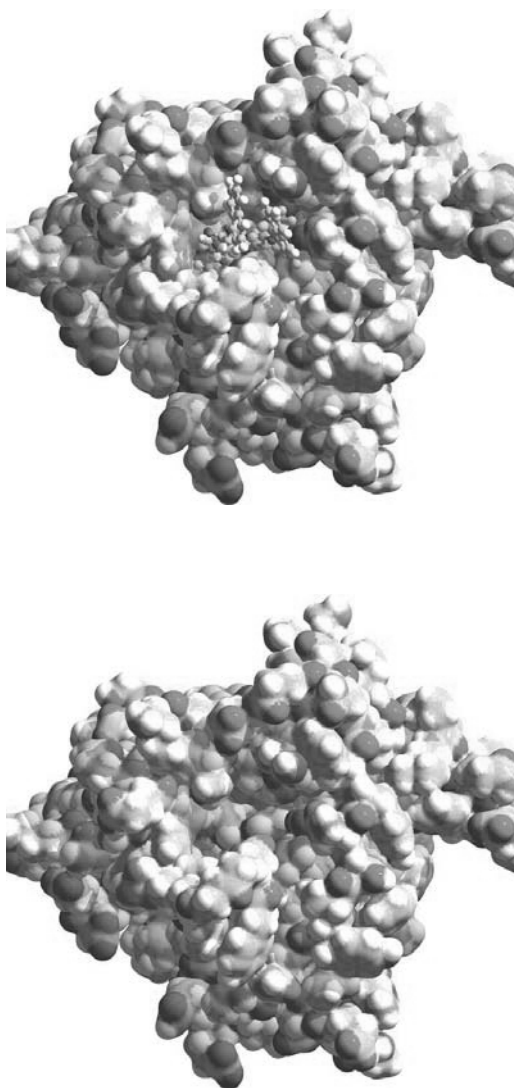


Figure S1. Top: Geometry optimized model of HAAG (colored surface) containing CIN and PPN (smaller ball and stick). Bottom: the same model without the drugs (CIN, PPN), showing more clearly the cavity of the binding site.

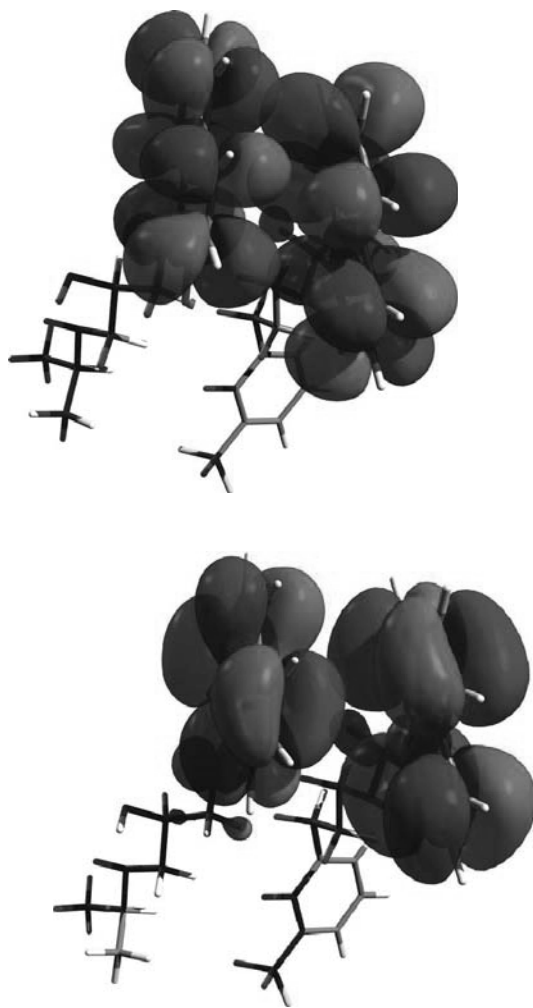


Figure S2. Molecular orbitals (MOs) involved in the electronic energy transfer from PPN(triplet) to CIN(ground state). **Top:** PPN triplet (donor) contains 71 α -electrons and 69 β -electrons, with the MO involved in the electron exchange being the SOMO (left). CIN ground state (acceptor) contains 94 α -electrons and 94 β -electrons, with the MO involved in the electron exchange being the LUMO (right). **Bottom:** SOMO-1 PPN triplet (left) and HOMO CIN (right).

References

- 1 Nishi, K.; Ono, T.; Nakamura, T.; Fukunaga, N.; Izumi, M.; Watanabe, H.; Suenaga, A.; Maruyama, T.; Yamagata, Y.; Curry, S.; Otagiri, M.; *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 14427.
- 2 (a) Gale, J. D. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1997**, *93*, 629. (b) Gale, J. D.; Rohl, A. L.; *Mol. Simul.* **2003**, *29*, 291.
- 3 Rappe, A. K.; Casewit, C. J.; Colwell, K. S.; Goddard III, W. A.; Skiff, W. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10024.
- 4 (a) Computer Simulation of Solids, Eds. Catlow, C. R. A.; Mackrodt, W. C.; Lecture Notes in Physics, Vol. 166, Springer, Berlin **1982**. (b) Catlow, C. R. A.; Cormack, A. N. *Int. Rev. Phys. Chem.* **1987**, *6*, 227.
- 5 Sastre, G.; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 1052-1058.
- 6 Hanwell, M. D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G. R. *J. Cheminform.* **2012**, *4*, 17.
- 7 Stewart, J. J. P.; *J. Mol. Mod.* **2013**, *1*, 19.
- 8 Stewart, J. J. P.; MOPAC2012, James J. P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, <http://openmopac.net> (**2012**).
- 9 Zhao Y.; Truhlar, D. G.; *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215.
- 10 Weigend, F.; Ahlrichs, R.; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 3297.
- 11 Gaussian 09, Revision A.02, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Norm, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian 09; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, **2009**.
- 12 Jacquemin, D.; Perpete, E. A.; Ciofini, I.; Adamo, C.; *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 1532.

Influence of drug encapsulation within mixed micelles on the excited state dynamics and accessibility to ionic quenchers

Eduarne Nuin,^a Miguel Gomez-Mendoza,^a M. Luisa Marin,^a Inmaculada Andreu^b and Miguel A. Miranda^{*a}

^aInstituto Universitario Mixto de Tecnología Química (UPV-CSIC), Universitat Politècnica de València. Avenida de los Naranjos s/n, 46022 Valencia. Spain

^bUnidad Mixta de Investigación IIS La Fe–UPV, Hospital La Fe, Avda. Campanar 21, 46009 Valencia, Spain

Email Address: mmiranda@qim.upv.es

Abstract

Photophysical techniques, specifically time-resolved fluorescence and laser flash photolysis, have proven to be non-invasive, straightforward and valuable tools to demonstrate how drug encapsulation into biomimetic mixed micelles (MM) influences the dynamics of excited states and their accessibility to ionic quenchers.

This concept has been illustrated by choosing a set of currently administered drugs containing a common naphthalene chromophore, namely (*S*)-naproxen and its methyl ester, (*R*)-cinacalcet and (*S*)-propranolol.

A remarkable increase of their triplet lifetimes is noticed when experiments are performed in MM, indicating efficient entrapment of the drugs in these supramolecular entities. Furthermore, a decrease of one order of magnitude in the quenching rate constant of the singlet and triplet excited states (by iodide or nitrite, respectively) is observed upon encapsulation into MM. This approach can in principle be extended to other microenvironments capable of incorporating photoactive compounds.

Keywords

Dynamic quenching; excited states; laser flash photolysis; mixed micelles; time-resolved fluorescence

Introduction

Encapsulation within biomimetic microenvironments, such as liposomes, cyclodextrins, micelles or bile salts is a very versatile tool in biology, biochemistry and medicine. These microheterogeneous systems have been employed as models to study the photochemical behavior of a variety of drugs and its dependence on the nature of the media.¹⁻⁴

In this context, mixed micelles (MM) made of phospholipids and bile salts have attracted increasing attention as nanocarriers in pharmaceutical formulations due to their important advantages, such as enhanced stability and reduced toxicity.⁵⁻⁹ In fact, MM have already been employed as suitable vehicles for poorly water-soluble drugs, such as diazepam⁵, tetrazepam,¹⁰ clonazepam,¹¹ diclofenac,^{12,13} indometacin,¹⁴ nimodipine,¹⁵ silybin¹⁶ and vitamin K.¹⁷ In this connection, based on their physiological compatibility and solubilizing capability, MM have been successfully used in the intravenous delivery of taxol.¹⁸

Encapsulation of bioactive compounds into microheterogeneous media has been demonstrated by different techniques that include dynamic light scattering,^{19,20} transmission electron microscopy,²¹ capillary electrophoresis,²² calorimetry,²³ small-angle X-ray scattering,²⁴ ultracentrifugation²⁵ and nuclear magnetic resonance.²⁶ However, most of them are based on indirect measurements and do not inform on the accessibility of the drugs inside biomimetic microenvironments. Therefore, more sensitive and direct methodologies would be desirable to investigate this matter. Recently, we have made use of photophysical techniques, specifically time-resolved fluorescence and laser flash photolysis (LFP), to prove the incorporation of compounds with different hydrophobicity into cholic acid (CA) aggregates.²⁷ Additionally, we have employed a photoactive dansyl-labelled cholesterol derivative to reveal efficient

incorporation of cholesterol (Ch) into the MM, thus demonstrating the outstanding solubilizing capability of MM.²⁸

With this background, the aim of the present work is to evaluate how the incorporation into biomimetic MM nanocarriers influences the excited state dynamics and accessibility to ionic quenchers. To achieve this goal, a few currently administered drugs containing a common naphthalene chromophore, appropriate for fluorescence and LFP experiments, have been selected. They include (*S*)-naproxen (NPX), a known non-steroidal anti-inflammatory drug, (*R*)-cinacalcet (CIN), used as calcimimetic agent and (*S*)-propranolol (PPN), a sympatholytic non-selective β -blocker employed for the treatment of hypertension (Figure 1A). The MM were prepared from lecithin (L), Ch and CA following our recently reported procedure.²⁸

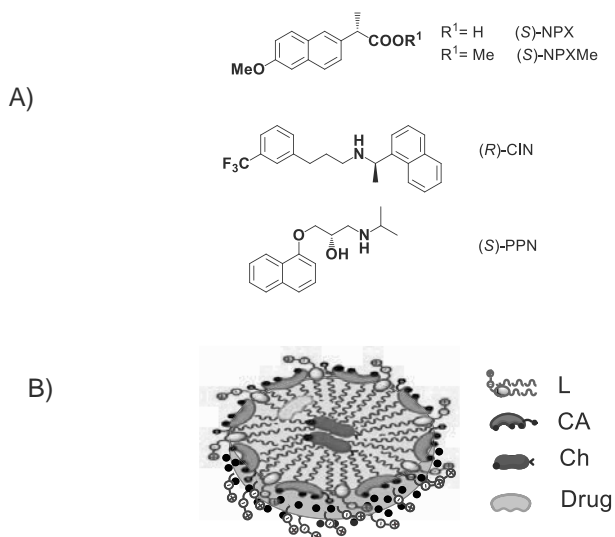


Figure 1. A) Chemical structures of drugs NPX, CIN, PPN and prodrug NPXMe. B) Cartoon representation of the drugs inside MM.

Experimental Methods

Chemicals. Lecithin, prepared from fresh egg yolk, Ch, NPX, PPN hydrochloride and NaCl were purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany) and used as received. The methyl ester NPXMe was synthesized as previously reported,²⁹ and CIN was obtained from commercial Mimpara® 60 mg (Amgen, Spain). Thus, the content of six pills was powdered in a mortar, suspended in 1 M NH₄OH (150 mL), and extracted with CH₂Cl₂ (4 x 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (3 x 150 mL) and water (3 x 150 mL), dried over MgSO₄, and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography through silica gel 60 (dichloromethane / methanol / 15 M ammonium hydroxide, 98:2:0.1 v/v/v) to give CIN as a colorless oil. Sodium cholate (NaCA) was provided by Acros Organics and used without further purification. All solvents used were of HPLC grade from Scharlab (Sentmenat, Spain). Milli-Q® water was used for sample preparation.

Preparation of mixed micelles. To a solution of 17.8 μmol of L and 38.8 μmol of NaCA in methanol, Ch (5.4 μmol) and the appropriate amount of the drug (0.027 or 0.27 μmol for fluorescence or LFP experiments, respectively) dissolved in the minimum amount of CH₂Cl₂ were added. The combined solutions were concentrated for thirty minutes at 50 °C, using a vacuum rotary evaporator, and then for thirty minutes at room temperature with an oil pump. The dry film obtained was hydrated with 1.37 mL of 0.2 M aqueous NaCl to form a clear MM solution.

Transmission electron microscopy (TEM). Images were collected with a Philips CM-10 microscope operating at 100 kV. A drop of the MM solution was sucked on a copper coated carbon grid for 1 min and then removed to leave a thin film. Then, negative staining was achieved using a drop of a 1% solution of ammonium molybdate for 1 min.

After removal of the excess, the resulting stained film was allowed to dry in a dust-free place.

Dynamic light scattering (DLS). Size measurements were conducted on MM with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, United Kingdom). The prepared MM were diluted using deionized water and subjected to DLS measurements at 25 °C and 173 ° scattering angles. The mean hydrodynamic diameter was obtained by cumulant analysis.

Photophysical instrumentation. Steady-state fluorescence experiments were performed on a Photon Technology International (PTI, Germany) LPS-220B spectrofluorometer, equipped with a 75 W Xe lamp and a monochromator in the region of 200-700 nm. Time-resolved fluorescence measurements were carried out with a Time Master fluorescence lifetime spectrometer TM 2/2003 from PTI, equipped with a hydrogen/nitrogen flash lamp as the excitation source. Laser flash photolysis experiments were carried out with a pulsed Nd:YAG SL404G-10 Spectron Laser Systems ($\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$, *ca.* 10 ns pulse width, < 20 mJ per pulse). A pulsed Lo255 Oriel Xenon lamp was employed as detecting light source. The LFP equipment includes also a 77200 Oriel monochromator, an Oriel photomultiplier tube (PMT) system made up of a 77348 side-on PMT, 70680 PMT housing, a 70705 PMT power supply and a TDS-640A Tektronix oscilloscope. The output signal from the oscilloscope was transferred to a personal computer.

Photophysical experiments. Emission measurements were performed in the 330-600 nm region at $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ concentration of the chromophore, under aerobic conditions. The kinetic traces were fitted by monoexponential decay functions, using a deconvolution procedure to separate them from the lamp pulse profile. For LFP experiments in 0.2 M NaCl aqueous solutions the samples were fixed by adjusting the

absorbance of the solutions at the arbitrary value of 0.2 at excitation wavelength. When the LFP measurements were carried out in MM, the concentration of the chromophore was 2×10^{-4} M. The triplet lifetimes were obtained from the monoexponential fitting of the decay traces registered at 420 nm. All the samples were bubbled with N₂. The aqueous solutions, the films and the quartz cells were bubbled for 2 hour, 1 hour and 30 min, respectively. All photophysical measurements were performed at room temperature using 10 x 10 mm² quartz cells with 4 mL capacity.

Results and discussion

Formation of MM and encapsulation of the drugs was achieved in one-pot. Thus, a combined dichloromethane solution of Ch and NPX, NPXMe, CIN or PPN was added to a solution of L and CA in methanol. After evaporation of the solvent and subsequent re-hydration of the film, MM containing the drugs were obtained. They were characterized by DLS and TEM measurements; the results were similar to those obtained for MM containing dansyl derivatives as photoactive probes.²⁸ The cartoon represents a MM, in which NPX, NPXMe, CIN or PPN have been incorporated into the hydrophobic part (Figure 1 B).

To check the influence of encapsulation inside MM on the drugs excited states, fluorescence and LFP experiments were performed both in aqueous solution (except for the insoluble NPXMe) and in MM. First, the shape of UV-visible absorption spectra of the drugs was identical into MM and in solution. Upon excitation at 290 nm fluorescence emission spectra were observed in MM, with maxima at 356, 350, 332 and 338 nm for NPX, NPXMe, CIN and PPN, respectively (Figure 2). In solution, the lifetimes of the singlet excited state were 8.3 ns (NPX), 28.6 ns (CIN) and 9.8 ns (PPN); no significant changes were observed between solution and MM, with the exception of

PPN whose lifetime increased up to 14.3 ns. Steady-state and time-resolved quenching experiments with iodide, which mainly remains in water, were performed to assess the extent of encapsulation. Indeed, Figure 3 shows the dynamic nature of the NPXMe, CIN and PPN quenching within MM upon addition of increasing concentrations of KI (in the range 0-90 mM).

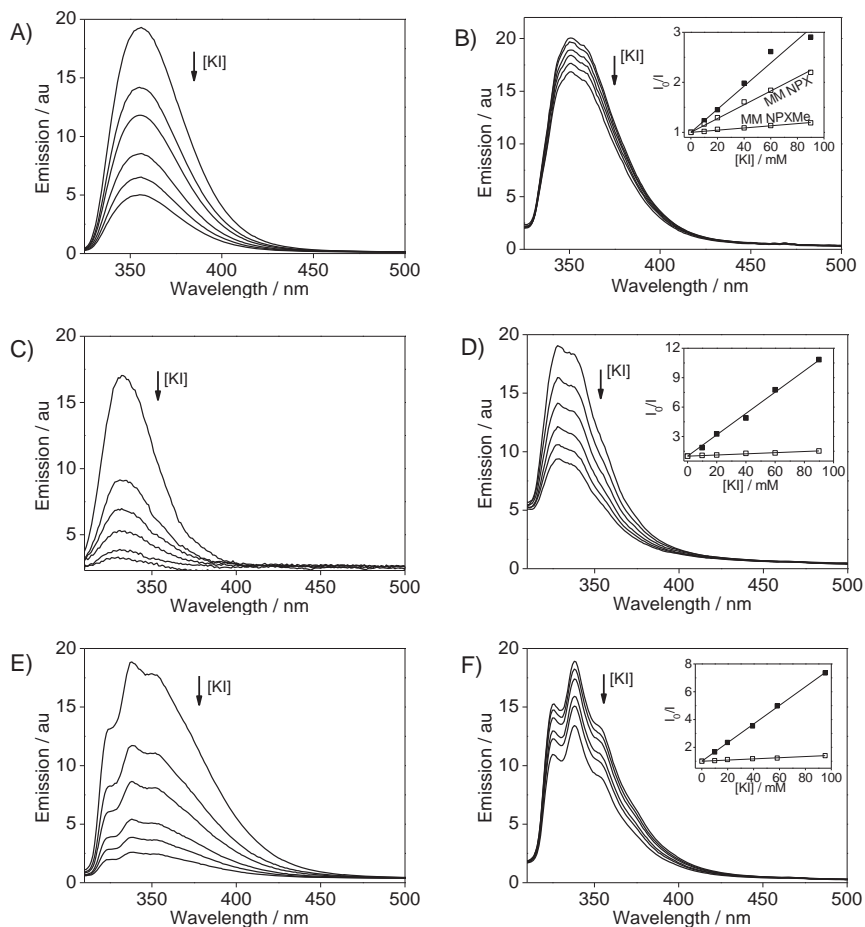


Figure 2. Emission spectra ($\lambda_{exc}=290$ nm) upon addition of increasing amounts of KI (0-90 mM) of NPX in 0.2 M aqueous NaCl (A) and NPXMe into MM (B), CIN in 0.2 M aqueous NaCl (C) and into MM (D), PPN in 0.2 M aqueous NaCl (E) and into MM (F). Insets: Stern-Volmer plots in solution (■) and in the presence of MM (□).

In all cases, the corresponding Stern-Volmer analysis (eqn 1) was compared to the results obtained in solution (see Figure 2 for steady-state measurements and Figure 3 for dynamic quenching).

$$I_0/I \text{ or } \tau_0/\tau = 1 + k_q\tau_0 [I^-] \quad (1)$$

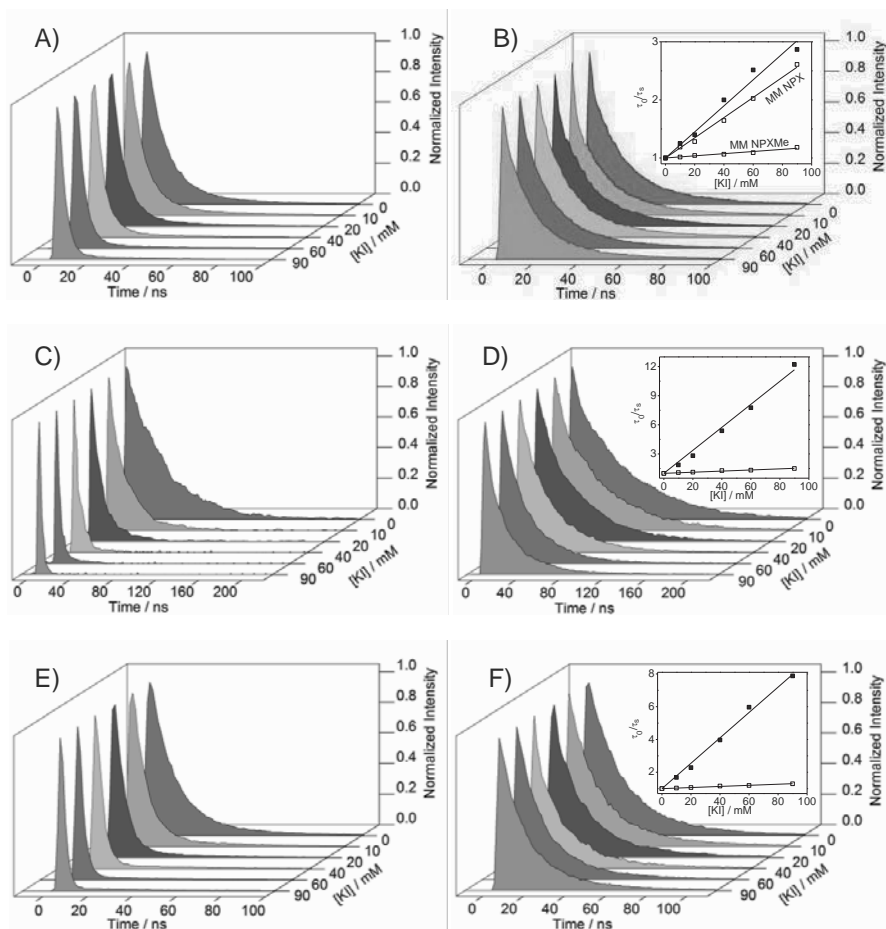


Figure 3. Changes in the emission decay traces ($\lambda_{exc} = 290$ nm) in the presence of increasing amounts of KI (0-90 mM) of NPX in 0.2 M aqueous NaCl (A) and its prodrug NPXMe into MM (B), CIN in 0.2 M aqueous NaCl (C) and into MM (D), PPN in 0.2 M aqueous NaCl (E) and into MM (F). Insets: Stern-Volmer plots in solution (■) and into MM (□).

The quenching rate constant (k_q) values were determined from fluorescence lifetimes in solution ($k_{q,sol}$) and in MM ($k_{q,MM}$) upon addition of increasing quencher concentrations. Table 1 shows that the k_q of NPXMe, CIN and PPN decreased by one order of magnitude when passing from solution to MM, whereas the k_q decrease observed for NPX was *ca.* one half as an evidence of the different accessibility of the singlet excited states of the studied chromophores to iodide.

It should be noticed that encapsulation of NPXMe, CIN, PPN within MM was very efficient, since the slopes of the Stern-Volmer plots in solution and in MM were of different order of magnitude; however, in the case of NPX a less marked difference was observed.

These values are in complete accordance with the expectation based on the higher hydrophobicity of NPXMe, CIN and PPN, compared to the free carboxylic acid NPX. Therefore, the fluorescence quenching experiments, using a salt that remains in solution, provide a clear evidence for drug entrapment within MM.

Table 1: Rate constants for singlet quenching by iodide.

Drugs	$k_{q,sol} \times 10^{-9} (M^{-1}s^{-1})^a$	$k_{q,MM} \times 10^{-9} (M^{-1}s^{-1})^a$
NPX	2.70 ± 0.13	1.73 ± 0.05
NPXMe	-	0.15 ± 0.01
CIN	4.12 ± 0.18	0.22 ± 0.01
PPN	7.90 ± 0.17	0.24 ± 0.01

^a The experiments were performed three times and the errors correspond to average deviations.

A further and complementary approach to investigate the influence of incorporation inside MM on the lifetimes of excited states and the accessibility to ionic quenchers was based on LFP experiments, again in solution and in MM.

Thus, the transient absorption spectra of NPX, CIN and PPN in solution displayed the typical naphthalene-like triplet-triplet absorption band^{26,27} at *ca.* 440 nm that remained unchanged upon incorporation into MM (Figure 4).^{30,31 30,31} However, a remarkable enhancement of the triplet lifetimes was observed for NPXMe, CIN and PPN into MM, indicating the sensitivity of this excited state to the microenvironment (Figure 4). In fact, when quenching experiments were carried out in the presence of increasing concentrations of NaNO₂ a small but significant quenching was observed in all cases, confirming the limited accessibility of the chromophores in the interior of MM. The triplet decays were fitted to a monoexponential function, and the quenching rate constants were determined in solution ($k_{q,sol}$) and in MM ($k_{q,MM}$) (Table 2). Again a reduction by one order of magnitude was observed in all cases upon incorporation into MM. For NPXMe and CIN the quenching plots were linear, whereas for PPN they were curved. Thus, the data for PPN were also analyzed taking into account the in-out equilibrium, using the model previously described in the literature.³²

Applying the above model, the rate constant determined for PPN triplet quenching by nitrite was $1.32 \pm 0.04 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

The obtained results are in complete agreement with those found from the fluorescence quenching experiments. Therefore, the LFP technique has demonstrated to be a very convenient tool to evaluate the influence of drugs entrapment within the MM microenvironment on the photophysical properties.

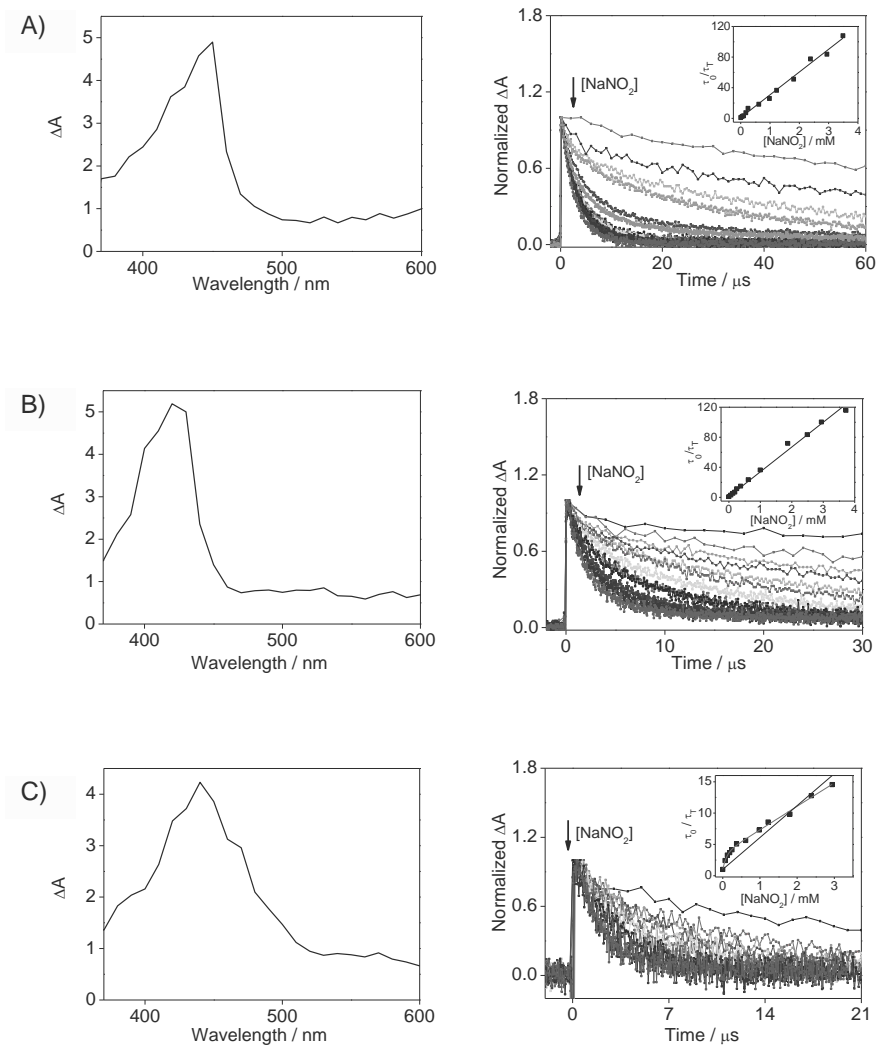


Figure 4: Transient absorption spectra (left) and decay traces (right) monitored at 420 nm ($\lambda_{exc} = 266$ nm) for drugs within MM in deaerated 0.2 M NaCl aqueous solution upon addition of increasing amounts of $NaNO_2$. Insets: corresponding Stern-Volmer plots. NPXMe (A), CIN (B) and PPN (C).

Table 2: Determined rate constants for triplet quenching by nitrite.

Drugs	$k_{q,\text{sol}} \times 10^{-9} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})^{\text{a}}$	$k_{q,\text{MM}} \times 10^{-9} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})^{\text{a}}$
NPXMe	1.10 ± 0.08 (NPX)	0.17 ± 0.01
CIN	3.90 ± 0.10	0.11 ± 0.01
PPN*	1.90 ± 0.07	0.18 ± 0.01

^aThe experiments were performed three times and the errors correspond to average deviations. *At this drug concentration, quenching plots was curved.

In summary, the singlet and triplet excited states of NPXMe, CIN and PPN reveal efficient encapsulation of these drugs into MM. These species have proved to be useful reporters to evaluate the protection of chromophores from reagents that mainly remain in water. Moreover, a remarkable increase in the triplet lifetimes is also observed into MM, indicating the special environment existing in the interior of these microheterogeneous systems. Overall the combined fluorescence and LFP results demonstrate that photophysical techniques are non-invasive, direct and valuable tools to assess how the encapsulation inside MM influences the excited state dynamics and accessibility to ionic quenchers. This approach can be in principle extended to other microheterogeneous systems capable of incorporating photoactive compounds.

Acknowledgments

Financial support from the Generalitat Valenciana (Prometeo Program), the Spanish Government (Red RETICS de Investigación de Reacciones Adversas a Alergenos y Fármacos (RIRAAF), Servet Contract CP11/00154 for I. A., CTQ2009-13699, CTQ2010-14882 and Predoctoral FPU fellowship AP2008-03295 for M. G.-M.) is gratefully acknowledged.

References

- (1) De Guidi, G.; Ragusa, S.; Cambria, M. T.; Belvedere, A.; Catalfo, A.; Cambria, A. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 204.
- (2) Iglesias, E. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 531.
- (3) Jimenez, M. C.; Miranda, M. A.; Tormos, R. *J. Photochem. Photobiol., A* **1997**, *104*, 119.
- (4) Sortino, S. *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82*, 64.
- (5) Hammad, M. A.; Muller, B. W. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1998**, *46*, 361.
- (6) Porter, C. J. H.; Charman, W. N. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *50*, S127.
- (7) Porter, C. J. H.; Trevaskis, N. L.; Charman, W. N. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 231.
- (8) Rangel-Yagui, C. O.; Pessoa, A.; Tavares, L. C. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2005**, *8*, 147.
- (9) Garidel, P. L., J. Mixed Vesicles and Mixed Micelles: Formation, Thermodynamic Stability, and Pharmaceutical Aspects. In *Liposome Technology Liposome Technology*; 3rd ed., 2006; Vol. 1, pp 209-239.
- (10) Hammad, M. A.; Muller, B. W. *Eur. J. Pharm. Sci.* **1998**, *7*, 49.
- (11) Hammad, M. A.; Muller, B. W. *Int. J. Pharm.* **1998**, *169*, 55.
- (12) Hendradi, E.; Obata, Y.; Isowa, K.; Nagai, T.; Takayama, K. *Biol. Pharm. Bull.* **2003**, *26*, 1739.
- (13) Parsaee, S.; Sarbolouki, M. N.; Parnianpour, M. *Int. J. Pharm.* **2002**, *241*, 185.
- (14) Hammad, M. A.; Muller, B. W. *Pharmazie* **1998**, *53*, 790.

- (15) Song, X.; Jiang, Y.; Ren, C.; Sun, X.; Zhang, Q.; Gong, T.; Zhang, Z. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 3689.
- (16) Yu, J.-n.; Zhu, Y.; Wang, L.; Peng, M.; Tong, S.-s.; Cao, X.; Qiu, H.; Xu, X.-m. *Acta Pharmacol. Sin.* **2010**, *31*, 759.
- (17) Sznitowska, M.; Klunder, M.; Placzek, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 70.
- (18) Alkanonyuksel, H.; Ramakrishnan, S.; Chai, H. B.; Pezzuto, J. M. *Pharm. Res.* **1994**, *11*, 206.
- (19) Cohen, D. E.; Thurston, G. M.; Chamberlin, R. A.; Benedek, G. B.; Carey, M. C. *Biochemistry* **1998**, *37*, 14798.
- (20) Sun, C. Q.; Sano, Y.; Kashiwagi, H.; Ueno, M. *Colloid Polym. Sci.* **2002**, *280*, 900.
- (21) delaMaza, A.; Manich, A. M.; Parra, J. L. *J. Microsc-Oxford* **1997**, *186*, 75.
- (22) Schwarz, M. A.; Raith, K.; Ruettinger, H. H.; Dongowski, G.; Neubert, R. H. H. *J. Chromatogr., A* **1997**, *781*, 377.
- (23) Hildebrand, A.; Neubert, R.; Garidel, P.; Blume, A. *Langmuir* **2002**, *18*, 2836.
- (24) Muller, K. *Biochemistry* **1981**, *20*, 404.
- (25) Yuet, P. K.; Blankschtein, D.; Donovan, J. M. *Hepatology* **1996**, *23*, 896.
- (26) Stark, R. E.; Roberts, M. F. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1984**, *770*, 115.
- (27) Gomez-Mendoza, M.; Nuin, E.; Andreu, I.; Marin, M. L.; Miranda, M. *A. J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 10213.
- (28) Nuin, E.; Gomez-Mendoza, M.; Andreu, I.; Marin, M. L.; Miranda, M. *A. Org Lett* **2013**, *15*, 298.
- (29) Tsai, S. W.; Huang, C. M. *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *25*, 682.
- (30) Nuin, E.; Andreu, I.; Torres, M. J.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *Journal of Physical Chemistry B* **2011**, *115*, 1158.
- (31) Perez-Ruiz, R.; Alonso, R.; Nuin, E.; Andreu, I.; Jimenez, M. C.; Miranda, M. A. *Journal of Physical Chemistry B* **2011**, *115*, 4460.
- (32) Bohne, C. *Langmuir* **2006**, *22*, 9100.

