

Resumen

En esta tesis se ha desarrollado una estrategia multidisciplinar que incluye la irradiación de complejos ligando/proteína junto con estudios de fluorescencia y/o espectroscopía de absorción transitoria, cromatografía de exclusión por tamaño seguida de espectroscopía de absorción y/o fluorescencia, análisis proteómico y modelización (docking y simulaciones de dinámica molecular) con el fin de profundizar y obtener información relevante en procesos relacionados con la formación de complejos irreversibles ligando-proteína. Ello ha permitido lograr la descripción del centro de reconocimiento molecular de albúminas séricas de distintas especies por el fármaco carprofeno, profundizar en procesos de fotoalergia producidos por el metabolito del fármaco triflusal y llevar a cabo el marcaje de residuos de lisina de la albúmina sérica humana por fotogeneración de electrófilos latentes “quinone methide”. A continuación se describen brevemente cada uno de estos aspectos.

En primer lugar, se ha estudiado la posible existencia de un centro de reconocimiento común en las albúminas séricas (AS) de diferentes especies empleando el fármaco antiinflamatorio no esteroideo (S)-carprofeno (CPF) como sonda fotoactiva. Así, se ha seguido la irradiación de los complejos de CPF/SA a $\lambda_{\text{max}} = 320$ nm por fluorescencia, mostrándose un aumento de la emisión debido a la deshalogenación. Tras la cromatografía de filtración en gel, la fracción proteica presentaba emisión proveniente del ligando, verificando la unión covalente del radical fotogenerado intermedio CBZ[•] a las AS. El análisis proteómico reveló la incorporación de CBZ[•] en varias posiciones en las diferentes albúminas. Se observaron modificaciones en la interfaz IB/IIIA en todos los casos (Tyr452 en las albúminas séricas humana, conejo y rata y Tyr451 en las albúminas séricas bovina, cerdo y oveja). Estudios de docking y de simulación de dinámica molecular el caso de albúmina sérica humana corroboraron las modificaciones covalentes observadas experimentalmente.

Posteriormente, se ha investigado la unión fotoquímica del HTB, el metabolito del antiagregante plaquetario triflusal a albúmina sérica humana (ASH). El análisis proteómico de las disoluciones de HTB/ASH tras ser irradiadas mostró la adición de HTB en los grupos ϵ -amino de los residuos Lys137, Lys199, Lys205, Lys352, Lys432, Lys541, Lys545 y Lys525 de la ASH. El mecanismo de reacción parece implicar la substitución del grupo CF₃ del HTB por un nuevo residuo amida. Solo el residuo Lys199 se localiza en una cavidad interna de la proteína mientras que el resto de los residuos

modificados resultaron estar situados en la parte externa. Los estudios computacionales revelaron que la unión supramolecular de HTB a ASH se produce en la región "V-cleft". Esta unión fotoquímica puede estar en la base de la aparición de efectos secundarios fotoalérgicos no deseados.

Finalmente, se ha demostrado la utilidad de los 4-trifluorometilfenoles como precursores de electrófilos latentes tipo "quinone methide" (QM) para la unión específica a residuos de lisina que se encuentran en los sitios de unión de la proteína. Así, se ha observado que estos aceptores de Michael, generados de modo fotoinducido, han sido capaces de realizar una modificación covalente específica de residuos de lisina en albúmina sérica humana (ASH). En concreto, los intermedios reactivos de tipo QM generados tras la irradiación de los complejos 4-trifluorometil-1-naftol o 4- (4-trifluorometilfenil) fenol con ASH exhibieron selectividad química hacia los residuos de lisina dando lugar a aductos de amida. Un estudio detallado realizado mediante análisis proteómico confirmó este hecho. Así, para el derivado de naftol se observó la modificación covalente de los residuos Lys106 y Lys414 (ubicados en los subdominios IA y IIIA, respectivamente), mientras que para el derivado de bifenilol ocurrió la modificación en la Lys195 (en el subdominio IIA). Los estudios teóricos proporcionaron una visión más profunda a nivel molecular de la selectividad observada experimentalmente.