

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Departamento de Química

Instituto de Tecnología Química (UPV / CSIC)



**ESTADOS EXCITADOS DEL
ANTIINFLAMATORIO NO ESTEROIDEO
FLURBIPROFENO COMO SONDAS PARA LA
INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Ignacio Vayá Pérez

Dirigida por:

Dr. Miguel A. Miranda Alonso

Dra. M. Consuelo Jiménez Molero

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Departamento de Química

Instituto de Tecnología Química (UPV / CSIC)



**ESTADOS EXCITADOS DEL
ANTIINFLAMATORIO NO ESTEROIDEO
FLURBIPROFENO COMO SONDAS PARA LA
INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Ignacio Vayá Pérez

Dirigida por:

Dr. Miguel A. Miranda Alonso

Dra. M. Consuelo Jiménez Molero

Valencia, 2007

D. MIGUEL ÁNGEL MIRANDA ALONSO, Profesor Catedrático de Química de la Universidad Politécnica de Valencia, y Dña. MARIA CONSUELO JIMÉNEZ MOLERO, Profesora Titular de Escuela Universitaria de la Universidad Politécnica de Valencia,

CERTIFICAN: Que la presente tesis doctoral, titulada: “**Estados excitados del antiinflamatorio no esteroideo flurbiprofeno como sondas para la interacción con proteínas**”, ha sido desarrollada por IGNACIO VAYÁ PÉREZ, bajo su dirección, en el Departamento de Química-Instituto de Tecnología Química (UPV/CSIC) de la Universidad Politécnica de Valencia.

D. Miguel A. Miranda Alonso

Dña. M. Consuelo Jiménez Molero

A mi familia

Agradecimientos

Suele decirse que todo lo que se empieza debe llegar a su fin, y en este caso ha llegado el momento de que esta “aventura” llamada tesis doctoral, en la que he tenido la fortuna de haber disfrutado de entrañables y divertidos momentos con amigos, compañeros, etc, y de haber conocido a gran cantidad de gente interesante, concluya. Han sido muchas las personas que de un modo u otro me han acompañado en este viaje, y a todos y cada uno de ellos quisiera mostrarles mi más sincera gratitud.

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres y hermanos su incondicional ayuda y apoyo, no sólo a lo largo de éste período, sino desde que tengo uso de razón. Ellos han tenido la paciencia, la entereza y la energía de haberme educado y haber hecho de mí la persona que en estos momentos escribe estas modestas palabras. Siempre han estado a mi lado, y estoy convencido que lo seguirán estando para todo aquello que necesite. Ni que decir cabe que entre ellos incluyo a mis tíos y primos más cercanos, a mi abuela, a mi cuñada y a mi encantadora, guapísima y simpática sobrina Alba, que desde que llegó a nuestro lado no para de robarnos sonrisas y deleitarnos con su inocente alegría.

A mis directores de tesis, Chelo Jiménez y Miguel Ángel Miranda, que me brindaron la oportunidad de trabajar bajo su dirección en un excelente grupo. Gracias por la confianza que depositasteis en mí y por haberme hecho partícipe de este proyecto en el que he podido disfrutar de vuestro entusiasmo y conocimientos.

Al Ministerio de Educación y Ciencia, por la concesión de una beca predoctoral F.P.U.

A mis compañeros del departamento, pero en especial a la gente del laboratorio 2.2: Raúl, Nour (Belmadoui), Liliana, Edgar, Inma, Juan, Carlos, Pavel, etc. Han conseguido que los días en el laboratorio (algunos interminables y tediosos) hayan sido más amenos y llevaderos. Con ellos he podido disfrutar de un gran ambiente de trabajo, distendido y agradable, con el buen humor (y chistes malos!!) de Raúl, el buen ánimo y positivismo de Nour, la simpatía de Lili, la tranquilidad de Edgar, el humor irónico de Juan, el carácter de Inma, el “buen rollo” de Carlos y Pavel,... Al resto de compañeros de grupo, la gente del ITQ y de Burjassot (Cecilia, Jana, Jérôme, Virginie, Paco, Raquel, María, Maica, etc.), con los que he compartido y disfrutado cenas, fiestas, congresos y demás, y a los profesores.

A los técnicos del departamento, en especial a Manolo, que ha tenido la paciencia de solucionar los problemas que surgían en los aparatos.

A los amigos con los que te he tenido el placer de disfrutar de inolvidables tardes de cervecero y entretenidas charlas de todo tipo y condición, de salidas nocturnas, viajes, etc. Entre ellos no puedo dejar de nombrar a Sergio, Firás, Sergio (Neivy), Alberto, Nour,... En este grupo debo incluir a la gente que he conocido a lo largo de estos años, como Virginia, Antonio (Sánchez Coronilla), Raúl,... Los congresos no hubiesen sido lo mismo sin vosotros.

Obviamente, no me olvido de mis amigos de Canals, con los que siempre he podido contar, y espero seguir haciéndolo, y he tenido la suerte de disfrutar y compartir momentos únicos; viajes, cenas, fiestas, tardes de cervezas, paellas, etc, etc, etc. Gracias a todos, pero me voy a permitir el privilegio de hacer una mención especial a Toni, Quique y Rafa, por ser como son, que ya es suficiente!!! También incluyo a los

amigos de Valencia, como Edu, Yolanda, Julián, Adrián, Migue,... por esas cenas, salidas y viajesitos varios.

Finalmente, pero no por ello menos importante, a María, por haber sido capaz de hacerme sonreír cuando lo he necesitado, y que con su encantadora forma de ser, simpatía y agradable compañía ha conseguido que éste año haya sido realmente especial.

A todos vosotros, muchas gracias!!!

Abreviaturas y símbolos

AA	Ácido araquidónico
a.a.	Aminoácido
AC	Ácido cáprico
ACF	Acetofenona
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
Ala	Alanina
Arg	Arginina
AS	Albúmina sérica
ASB	Albúmina sérica bovina
ASH	Albúmina sérica humana
ATP	Ácido tiaprofénico
BP	Bifenilo
BtOH	1-hidroxibenzotriazol
BZP	Benzofenona
CD₃OD	Metanol deuterado
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CI	Conversión interna
CIS	Cruce intersistemas
COX	Ciclooxigenasa
CPF	Carprofeno
Cys	Cisteína
δ	Desplazamiento químico
D.O.	Densidad óptica
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
ϵ	Constante dieléctrica
EDC	Hidrocloruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
ϵ_T	Coefficiente de absorción molar de triplete
EX	Exciplejo
EXC	Excímero
F	Fluorescencia
FBP	Flurbiprofeno
FBPMe	Éster metílico del flurbiprofeno
ϕ_{CIS}	Rendimiento cuántico de cruce intersistemas
FDL	Fotólisis de destello láser
ϕ_F	Rendimiento cuántico de fluorescencia

ϕ_{NR}	Rendimiento cuántico de desactivación no radiante
Glu	Glutamina
Gly	Glicina
His	Histidina
IBP	Ibuprofeno
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
k_{CIS}	Constante de desactivación de cruce intersistemas
k_D	Constante de desactivación
k_F	Constante de desactivación de fluorescencia
k_{NR}	Constante de desactivación no radiante
k_P	Constante de desactivación de fosforescencia
KPF	Ketoprofeno
LTs	Leucotrienos
Lys	Lisina
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
N-Ac-(S)-TyrEt	Éster etílico de la N-acetil-(S)-tirosina
NPX	Naproxeno
P	Fosforescencia
PBS	Disolución tampón de fosfato
PGs	Prostaglandinas
Phe	Fenilalanina
ppm	Partes por millón
RMN-¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono
RMN-¹H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RTE	Retrotransferencia electrónica
RV	Relajación vibracional
S	Singlete
Ser	Serina
SP	Suprofeno
T	Triplete
TEI	Transferencia electrónica
TE	Transferencia de energía
TESS	Transferencia de energía singlete-singlete
TETT	Transferencia de energía triplete-triplete

τ_F	Tiempo de vida de fluorescencia
Trp	Triptófano
TrpMe	Éster metílico del triptófano
TrpOH	Triptofanol
τ_T	Tiempo de vida de triplete
TXs	Tromboxanos
Tyr	Tirosina
TyrMe	Éster metílico de la tirosina
u.a.	Unidades arbitrarias
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta visible
Val	Valina

Índice

CAPÍTULO 1. Introducción

Parte I: Proteínas	3
1.1. Aspectos generales	3
1.2. Tipos de proteínas	4
1.2.1. Albúmina sérica (AS)	6
1.2.1.1. Función de la albúmina	7
1.2.1.2. Estructura general de la albúmina	9
1.2.1.3. Interacción con sustratos	10
1.2.2. Ciclooxigenasa (COX)	16
1.2.3. Lipasas	21
Parte II: Antiinflamatorios no esteroideos	23
1.3. Perspectiva histórica	23
1.4. Actividad farmacológica de los AINES	24
1.4.1. Prostaglandinas: inflamación y dolor	25
1.4.2. Mecanismo de acción de los AINES	26
1.4.3. Los AINES como inhibidores de COX	27
1.5. Ácidos 2-arilpropiónicos	28
1.5.1. Efectos secundarios fotosensibilizados	29
1.5.2. Mecanismo de la fotosensibilización	31
1.6. Antecedentes bibliográficos	32
Parte III: Procesos fotoquímicos y fotofísicos	34
1.7. Transferencia de energía fotoinducida (TE)	38
1.8. Transferencia electrónica y formación de excíplejos fotoinducida	39
1.9. Transferencia de protón fotoinducida (TP)	41
1.10. Formación de excímero	41
1.11. Referencias bibliográficas	43

CAPÍTULO 2. Objetivos y metodología

2.1. Objetivo general	51
2.2. Objetivos concretos y metodología	52

CAPÍTULO 3. Caracterización de los estados excitados del (S)-flurbiprofeno

3.1. Introducción.....	57
3.2. Resultados y Discusión	60
3.2.1. Estudios de fluorescencia	60
3.2.2. Estudios de fotólisis de destello láser.....	62
3.2.3. Estudios fotoquímicos	68
3.3. Conclusiones.....	71
3.4. Parte experimental	73
3.4.1. Materiales y disolventes	73
3.4.2. Medidas de fluorescencia.....	73
3.4.3. Medidas de fotólisis de destello láser.....	74
3.4.4. Fotólisis en estado estacionario	77
3.5. Referencias bibliográficas	80

CAPÍTULO 4. Sistemas intramoleculares flurbiprofeno-aminoácido

4.1. Introducción.....	85
4.2. Resultados y Discusión	87
4.2.1. Estudios fotofísicos de las diadas FBP-Trp en acetonitrilo	87
4.2.2. Estudios fotofísicos de las diadas FBP-Trp en 1,4-dioxano.....	102

4.2.3. Estudios fotofísicos de las diadas FBP-Tyr en acetonitrilo	108
4.2.4. Estudios fotofísicos de las diadas FBP-Tyr en 1,4-dioxano.....	113
4.3. Conclusiones.....	116
4.4. Parte experimental	118
4.4.1. Materiales y disolventes	118
4.4.2. General.....	118
4.4.3. Medidas de fluorescencia.....	119
4.4.4. Medidas de fotólisis de destello láser.....	119
4.4.5. Síntesis de las diadas	120
4.5. Referencias bibliográficas	138

CAPÍTULO 5. Estudio de las interacciones FBPMe/AS

5.1. Introducción.....	143
5.2. Resultados y Discusión	145
5.2.1. Caracterización de FBPMe.....	145
5.2.2. Sistemas FBPMe/ASH	147
5.2.3. Sistemas FBPMe/ASB.....	157
5.2.4. Interacciones competitivas: ASH vs. ASB	162
5.3. Conclusiones.....	165
5.4. Parte experimental	166
5.4.1. Materiales y disolventes	166
5.4.2. Síntesis de (S)- y (R)-FBPMe.....	166
5.4.3. General.....	171
5.4.4. Experimentos de fotólisis de destello láser	171
5.5. Referencias bibliográficas	175

CAPÍTULO 6. Estudio de las interacciones FBP/AS

6.1. Introducción.....	179
6.2. Resultados y discusión.....	180
6.2.1. Sistemas (S)-flurbiprofeno/albúmina sérica.....	180
6.2.1.1. Sistema (S)-FBP/ASH	180
6.2.1.2. Sistema (S)-FBP/ASB	186
6.2.2. Sistemas (R)-flurbiprofeno/albúmina sérica	191
6.2.2.1. Sistema (R)-FBP/ASH	191
6.2.2.2. Sistema (R)-FBP/ASB	195
6.3. Conclusiones.....	199
6.4. Parte experimental	200
6.4.1. Materiales y disolventes	200
6.4.2. Experimentos de fotólisis de destello láser	200
6.5. Referencias bibliográficas	204

CAPÍTULO 7. Instrumentación

7.1. Instrumentación general.....	207
7.2. Instrumentación fotoquímica	208

CONCLUSIONES	213
---------------------------	------------

RESÚMENES.....	219
-----------------------	------------

ANEXO I. Técnicas fotofísicas: fluorescencia y fotólisis	
de destello láser	231

ANEXO II. Contribución a congresos.....	239
--	------------

ANEXO III. Publicaciones	245
---------------------------------------	------------

CAPÍTULO 1. Introducción

Parte I: Proteínas

1.1. Aspectos generales

Las proteínas son macromoléculas muy abundantes en los organismos vivos. Cumplen con diversas funciones vitales, pudiendo actuar como enzimas, hormonas, anticuerpos o como vehículo de transporte de diversas sustancias, tanto endógenas como exógenas.¹

Desde el punto de vista estructural, las proteínas pueden ser consideradas como polímeros lineales formados por aminoácidos. Tanto la interacción entre los aminoácidos de la cadena polipeptídica como la disposición geométrica que adoptan conduce a la formación del *sitio de unión* o *centro activo*, el cual constituye una cavidad donde tiene lugar la interacción específica entre sustratos de distinta naturaleza y la proteína, y por tanto, donde la proteína desarrolla sus funciones propias.² Este centro activo está formado por las cadenas laterales de los residuos de aminoácido específicos que forman parte del mismo, lo que le confiere una disposición tridimensional particular distinta al resto de la proteína.³

En la Figura 1.1 se muestra de forma esquemática la interacción entre un sustrato y el sitio de unión de la proteína.

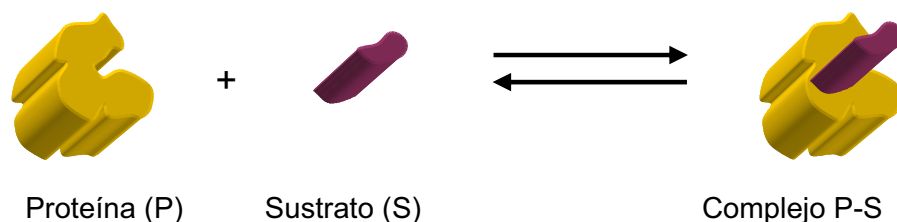


Figura 1.1. Esquema de la formación de un complejo proteína-sustrato (P-S).

Generalmente, las interacciones más significativas que tienen lugar entre un sustrato y los aminoácidos del centro activo de la proteína son de naturaleza iónica, por enlace de hidrógeno o tipo van der Waals.

1.2. Tipos de proteínas

Las proteínas pueden interactuar con un variado tipo de sustratos, como iones metálicos (calcio, magnesio, etc), vitaminas, ácidos grasos, fármacos, etc. Las proteínas que son susceptibles de interactuar con fármacos forman parte de las denominadas *dianas farmacológicas*. Entre ellas se encuentran las proteínas transportadoras, los receptores y algunas enzimas.⁴

➤ Las *proteínas transportadoras* son aquellas que proporcionan un medio de transporte, bien en el plasma o a través de la membrana celular, a aquellos sustratos que interactúan en el centro activo de ésta. Como ejemplos de proteínas transportadoras se pueden citar la hemoglobina, que se encuentra en el interior de los glóbulos rojos y transporta el oxígeno desde los pulmones al resto del cuerpo, las albúminas séricas,⁵ que son proteínas plasmáticas que actúan como vehículo de diversos agentes, tanto endógenos (ácidos grasos, hormonas, enzimas) como exógenos (fármacos) y la α -glicoproteína ácida.⁶

➤ Los *receptores farmacológicos* son moléculas, generalmente de naturaleza proteica, que se encuentran en la membrana celular o intracelularmente, en las que el fármaco desarrolla su acción al interactuar en el centro activo de éstas. Las interacciones que tienen

lugar entre el fármaco y el receptor son generalmente lábiles y reversibles. Mediante la combinación química del fármaco con el receptor, éste último sufre un cambio configuracional que origina una respuesta funcional en la célula, que es, en definitiva, resultado del efecto farmacológico, como por ejemplo la contracción o relajación de un músculo, el aumento o la inhibición de la secreción de una glándula, la apertura o el bloqueo de un canal iónico, las variaciones del metabolismo celular, la activación de enzimas y proteínas intracelulares o inhibición de las mismas, etc. Algunos fármacos actúan modificando reacciones celulares que son desarrolladas enzimáticamente por interacción del fármaco sobre dichos receptores enzimáticos. Entre estos, se pueden destacar la fosfolipasa A2 (inhibida por glucocorticoides), la ciclooxigenasa (inhibida por AINES), etc.

➤ Las *enzimas* son biocatalizadores de naturaleza proteica.^{7,8} Todas las reacciones químicas del metabolismo celular se realizan gracias a la acción de estos catalizadores, cuya función principal es la de incrementar la velocidad de los procesos químicos, actuando sobre un sustrato de forma específica y enormemente eficiente. Las enzimas son fundamentales, ya que las funciones vitales de cualquier célula serían imposibles de mantener si las reacciones que ocurren en ella fueran demasiado lentas.⁸ Ejemplos de enzimas son los citocromos P450 o las lipasas.

En la Figura 1.2 se muestran algunos ejemplos de las proteínas descritas.

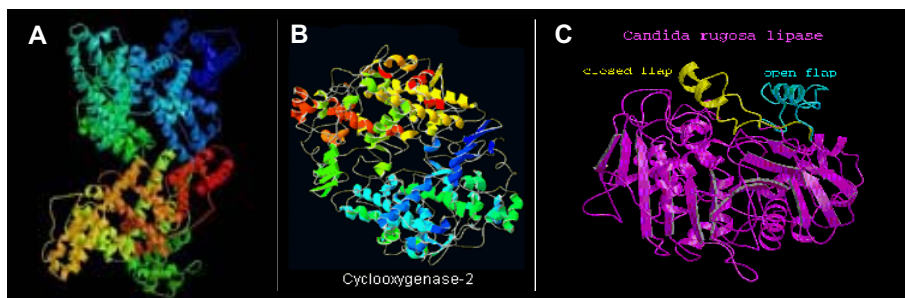


Figura 1.2. A) Albúmina sérica humana (proteína transportadora). B) Ciclooxygenasa-2 (receptor farmacológico). C) Lipasa de *Cándida rugosa* (enzima).

1.2.1. Albúmina Sérica (AS)

La albúmina sérica humana (ASH), junto con la hemoglobina, es probablemente una de las primeras proteínas del cuerpo humano que llamó la atención de los investigadores. Son muchas sus aplicaciones, tanto en medicina clínica como en investigación básica. El físico griego Hipócrates de Cos ya indica en sus *Aforismos* que la aparición de espuma en la orina es debida, con toda probabilidad, a la presencia de un exceso de albúmina, indicativo de una dolencia crónica en el riñón. En 1837, H. Ansell cita en sus lecturas que “la albúmina es sin duda una de las proteínas más importantes en los animales, ya que no sólo se encuentra en la sangre sino también en la exhalación de ciertas superficies, en diversos fluidos celulares (como en tejidos y en los ojos) y en muchos otros fluidos animales”.

Existen albúminas séricas de distinta naturaleza. Se pueden extraer de ratas, conejos, caballos, perros, humanos, etc, pero sin duda, las albúminas que han suscitado mayor interés son la albúmina sérica

humana (ASH) y la albúmina sérica bovina (ASB), debido a su fácil adquisición y bajo coste.⁵ La estructura de ambas albúminas se muestra en la Figura 1.3.

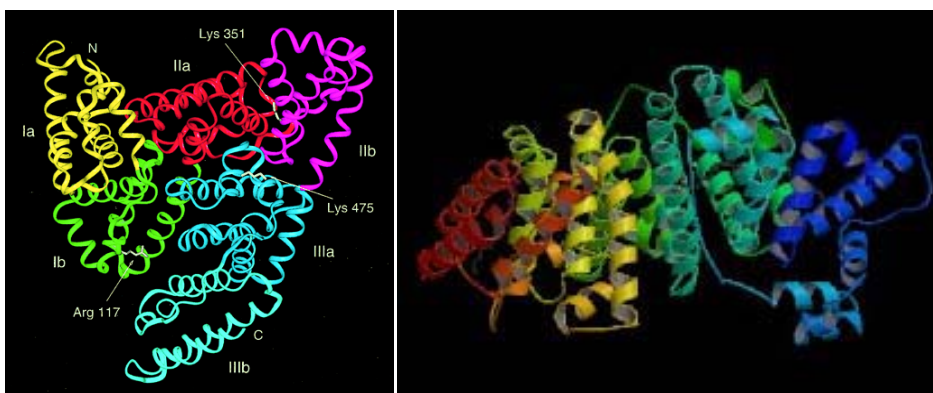


Figura 1.3. Estructura de la albúmina sérica humana (izquierda) y de la albúmina sérica bovina (derecha).

1.2.1.1. Función de la albúmina

La albúmina es una proteína que se sintetiza en el hígado. Está localizada en prácticamente todo el cuerpo. Existen grandes cantidades de albúmina en la piel, y puede encontrarse en cualquier fluido corporal, como por ejemplo en el fluido vítreo y acuoso ocular, en el sudor, en las lágrimas, saliva, músculos, etc.

La AS ayuda a mantener el pH y la presión osmótica en la sangre.⁹ Su principal función es actuar como vehículo de transporte y distribución de sustancias endógenas y exógenas en la sangre. Ejemplo de ello es el transporte de fármacos (influyendo, así, en la farmacocinética y distribución de estos), de ácidos grasos aniónicos de cadena larga, ácidos biliares, hormonas, vitaminas, etc.¹⁰

La interacción de sustratos con AS puede originar un incremento en 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).¹¹

La albúmina actúa, en ocasiones, como almacén de ciertas toxinas, como cuando transporta la bilirrubina hasta el hígado para su excreción biliar. También es capaz de interactuar con toxinas exógenas, haciendo que sean menos nocivas para el organismo (como la interacción de AS con la aflatoxina G₁ (cancerígena), que es transportada hasta el hígado para su destrucción).¹²

En ocasiones la albúmina 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 de disulfiram.^{13,14} También presenta actividad esterasa en uno de sus múltiples sitios de unión, debido probablemente a la proximidad de la arginina-410 y la tirosina-411, pudiendo producir la hidrólisis de algunos glucurónidos, como el del carprofeno o el del ketoprofeno.^{15,16} La actividad esterasa de AS 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.¹⁷

1.2.1.2. Estructura general de la albúmina

La albúmina consiste en una cadena polipeptídica simple sin grupos prostéticos u otros aditivos, con una masa molecular aproximada de 67 KDa. 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. Cada uno de estos dominios contiene 2 logos y está separado de los contiguos por otro logo. Así pues, en cada dominio hay dos subdominios A y B. Por tanto, en las albúminas existe un amplio y variado número de sitios de unión donde los sustratos pueden interaccionar.⁵ En la Figura 1.4 se muestran los tres dominios de unión de la albúmina sérica humana.

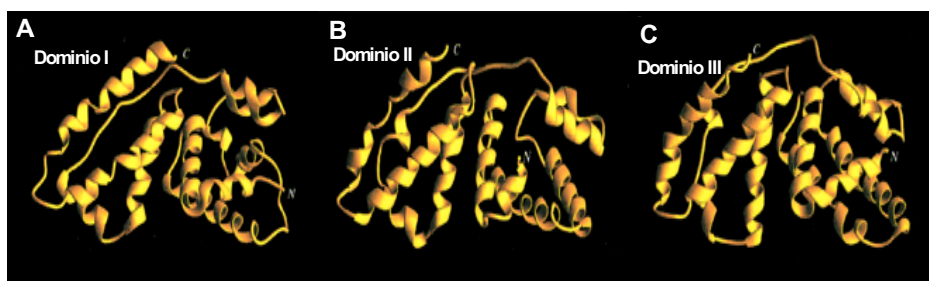


Figura 1.4. Estructura de los dominios I, II y III en ASH.

La **albúmina sérica humana** (ASH) es una proteína globular que constituye alrededor del 60% del total de proteína en la sangre. Posee una masa molecular promedio de 66500 Da y consta de 585 aminoácidos, entre los cuales se forman un total de 17 puentes disulfuro; existe un tiol libre (Cys-34) y un único triptófano (Trp-214).¹⁸ Según análisis cristalográficos de rayos-X de ASH, la cadena polipeptídica se dobla formando una hélice de dimensiones aproximadas de 80 x 80 x 30 Å, con cerca del 67% de hélice- α , un 10%

de giro β y un 23% de cadena extendida.^{9,19,20} Recientes estudios proponen que la conformación global de ASH en disolución neutra es muy similar a la observada en la forma cristalina.²¹

En el caso de la **albúmina sérica bovina** (ASB), el número de aminoácidos que la forman es de 583.²² La secuencia peptídica de ASB presenta una similitud del 76% con respecto a ASH. Sin embargo, ASB posee dos residuos de triptófano en lugar de uno. El primer triptófano, homólogo a ASH, se encuentra en la posición 213, 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 213 (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.⁵

Ambas albúminas (ASH y ASB) estructuralmente son muy similares. En general, las diferencias estructurales que se pueden observar entre ellas se derivan de la sustitución de ciertos aminoácidos hidrofóbicos por otro tipo de aminoácidos también hidrofóbicos, en lugar de otros de naturaleza polar.

1.2.1.3. Interacción con sustratos

Las albúminas son proteínas flexibles que pueden adaptar su estructura para interactuar con una gran variedad de sustratos en sus distintos dominios de unión (esteroides, zinc (II), cobre (II), calcio, magnesio, vitaminas, etc). Esta interacción puede generar cambios en la albúmina que provoquen un aumento en su estabilidad, una mayor afinidad hacia otros sustratos, etc.¹¹

Como se ha indicado anteriormente, la albúmina tiene gran afinidad por ácidos grasos, aminoácidos, metabolitos como la bilirrubina, y por fármacos, entre los que se encuentran los AINES.

❖ *Interacción con fármacos*

El estudio de la interacción fármaco/AS es importante para conocer la biodistribución, el metabolismo, la eliminación y el efecto farmacológico de éstos en el organismo.

Los AINES presentan un alto grado de unión con la albúmina, generalmente del 99%.¹¹ La naturaleza de estas interacciones es de tipo electrostático, por puente de hidrógeno, puente salino o de tipo van der Waals; el proceso, que generalmente es reversible, tiene unas constantes de asociación que oscilan entre 10^4 y 10^6 M⁻¹. En otras ocasiones, las interacciones entre AS y fármacos son irreversibles. Esto se da con ciertos tipos de metabolitos de los fármacos, y es más pronunciada con aquellos que tienen tendencia a formar glucurónidos.¹¹ También puede darse con fármacos que posean un grupo tiol capaz de unirse covalentemente con el residuo de aminoácido cisteína de la posición 34.²³ Este hecho es importante porque se puede alterar el destino metabólico del fármaco en cuestión, y porque puede cambiar tanto las propiedades estructurales como funcionales de la proteína. Estos aductos podrían causar efectos tóxicos, como hipersensibilidad y toxicidad hepática y renal aguda.

Aunque las albúminas séricas poseen varios dominios de unión con sustratos, se sigue aceptando por consenso la existencia de dos sitios específicos de unión o centros activos para moléculas orgánicas pequeñas. En el caso concreto de ASH, estos sitios de unión específicos

fueron designados por Sudlow como **sitio I** (o sitio de unión de la warfarina) y **sitio II** (o sitio de unión del diazepam).²⁴ En la Tabla 1.1 se muestran algunas características de los dos principales sitios de unión de ASH.

<i>Sitio de unión</i>	Sitio I	Sitio II
<i>Sustratos específicos</i>	Warfarina, dansilamida.	Dansilsarcosina, diazepam.
<i>Otros sustratos afines</i>	ésteres de los ácidos 2-arilpropiónicos	ácidos 2-arilpropiónicos
<i>Residuos de a.a. presentes</i>	Trp 214, Arg 218	His 146, Lys 194, Arg 410, Tyr 411

Tabla 1.1. Características de los dos principales sitios de unión de ASH.

El **sitio I** se encuentra situado en el subdominio IIA.¹⁸ Las interacciones que predominan en éste, son de tipo hidrofóbicas.²⁵ Ejemplos de sustratos del sitio I son warfarina, indometacina, fenilbutazona, etc. También es conocido que los ésteres de los ácidos 2-arilpropiónicos interaccionan preferentemente en este sitio de unión.²⁶ Algunas evidencias sugieren que el sitio I es flexible y de gran tamaño (moléculas grandes, como la bilirrubina, interaccionan en él). Esto puede ocasionar que sea más difícil observar estereoselectividad en la interacción con los sustratos. Los aminoácidos que tienen mayor relevancia para la interacción con fármacos son el Trp-214 y la Arg-218.

El **sitio II** está situado en el subdominio IIIA y es de menor tamaño y menos flexible que el sitio I.¹⁸ Por esta razón, se cree que las interacciones estereoselectivas se pueden observar en mayor grado en este sitio de unión. El ejemplo clásico se observa con el L-triptófano,

cuya afinidad por el sitio II es 100 veces mayor que la del isómero D. Las interacciones que predominan son de tipo puente de hidrógeno y electrostáticas.²⁵ Los sustratos que suelen unirse al sitio II son ácidos carboxílicos aromáticos, como los AINES de la familia de los ácidos 2-arilpropiónicos. Los aminoácidos Arg-410 y Tyr-411 desempeñan un papel importante en la interacción con los ligandos.¹⁸

En la Figura 1.5 se muestran los sitios de unión I y II de la ASH.

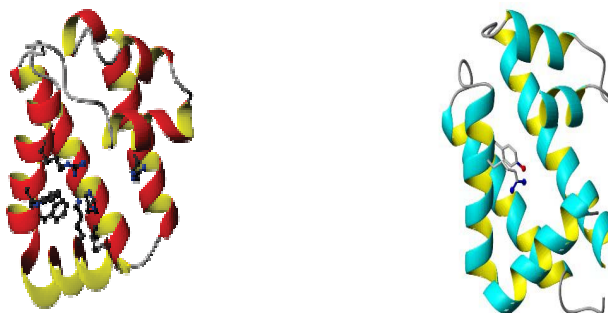


Figura 1.5. Sitio I (izquierda) y sitio II (derecha) en ASH.

Como se ha indicado anteriormente, esta clasificación realizada por Sudlow no engloba todos los sitios de unión específicos de alta afinidad que posee la albúmina para interactuar con los fármacos. Como ejemplo, el propofol interactúa tanto en el sitio II (subdominio IIIA) como en el subdominio IIIB.²⁷

❖ *Interacción con ácidos grasos*

Los ácidos grasos de cadena larga (C₁₆-C₂₀) son intermedios cruciales en el metabolismo lipídico. Se requieren para la síntesis de la membrana lipídica, de hormonas, y son una importante fuente de energía. Son altamente insolubles en el plasma sanguíneo, pero gracias a su interacción con la albúmina sérica aumenta su solubilidad, favoreciéndose así el transporte desde el hígado al riñón, de ahí al músculo y finalmente al tejido adiposo.⁵

Las albúminas séricas poseen un gran número de sitios de unión con ácidos grasos de distinto tamaño de cadena. Existen hasta siete sitios de unión distintos que pueden ser ocupados por este tipo de moléculas. Las interacciones que se dan son por puente salino o puente de hidrógeno entre el carboxilato del ácido graso y los residuos de aminoácido presentes en el centro de unión. También se observan interacciones hidrofóbicas entre la cadena lateral del ácido graso y el medio que le rodea.²⁸ Los ácidos grasos de cadena media (C₆-C₁₄) interactúan casi exclusivamente en el sitio II, mientras que los de cadena mayor lo hacen en el sitio I o en otros dominios de unión de la albúmina.²⁹

❖ *Interacciones competitivas*

Debido a la flexibilidad de la albúmina y a que ésta posee un número limitado de sitios de unión de alta afinidad con los sustratos, la unión, por ejemplo, de un fármaco o de un ácido graso a AS puede generar cambios en su estructura que puedan influir en la unión de nuevos fármacos.^{29,30} Esta alteración es importante porque se puede modificar la distribución y eliminación de un fármaco, pudiendo modular

sus efectos terapéuticos. Este riesgo es mayor cuando dos o más fármacos compiten por el mismo sitio de unión (o cuando un ácido graso desplaza al fármaco de su sitio de unión). En algunos casos esta competición entre dos ligandos por el mismo sitio puede generar un aumento en la concentración del fármaco desplazado, que pasa a encontrarse libre en el medio. Sin embargo, 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 entre ibuprofeno y carprofeno, donde este último desplaza al ibuprofeno de su sitio II, de mayor afinidad, al sitio I, de menor afinidad.³¹

Puesto que la actividad farmacológica de un fármaco depende de su concentración como forma libre en el medio, el desplazamiento a la sangre del fármaco previamente unido a ASH incrementaría la concentración libre de éste, produciendo un aumento de su actividad, que podría, incluso, generar toxicidad. Los desplazamientos desde el sitio de mayor afinidad a otro de menor afinidad 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.³² Por esta razón 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 que se debe suministrar de un fármaco durante la administración simultánea de otro.

1.2.2. Ciclooxygenasa (COX)

La enzima COX tiene como función catalizar la biosíntesis de prostaglandinas (PGs) a partir del ácido araquidónico (AA): el primer paso consiste en la oxidación de AA para formar PGG₂, que tras una posterior reducción forma PGH₂, la cual es transformada a través de una cascada de reacciones enzimáticas en los prostanoides primarios PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂, PGI₂ y TXA₂. Estos juegan un papel importante tanto en mantener las propiedades fisiológicas normales en el organismo como en el proceso inflamatorio.

Existen dos isoformas de COX: COX-1 y COX-2.^{33,34} La primera se expresa de forma constitutiva en casi todas las células del organismo, como en la mucosa gástrica, tejido renal, plaquetas, etc, y es responsable de la síntesis de PGs y TXA₂ con propiedades citoprotectoras. Sin embargo, COX-2 se expresa de forma constitutiva en el tejido renal, sinovial y en ciertas células del sistema nervioso central, pero también lo hace en células donde se ha inducido un proceso fisiopatológico nocivo, promoviendo la rápida formación de mediadores de la inflamación.³⁵⁻³⁷ Así pues, COX-2 es la principal responsable de los procesos inflamatorios. Por el contrario, también parece ser que está implicada en la producción de prostaciclina (PGI₂), una prostaglandina vasodilatadora y antitrombótica.

En general, se puede decir que COX-1 es responsable de la síntesis de prostaglandinas citoprotectoras, mientras que COX-2 se relaciona con la síntesis de prostaglandinas nocivas para el organismo (Figura 1.6).

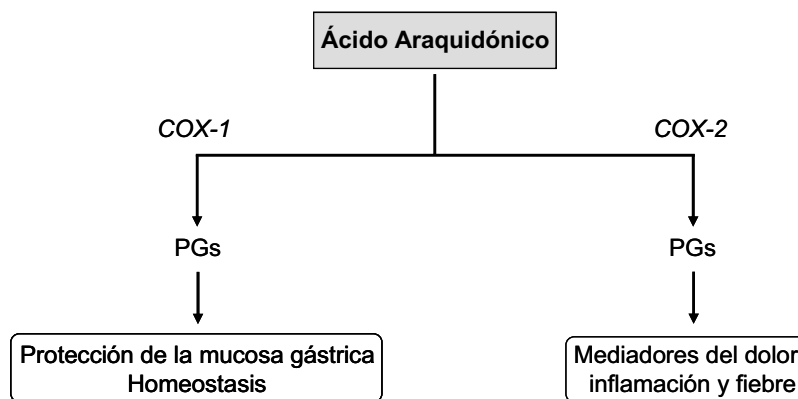


Figura 1.6. Esquema general de la formación de prostaglandinas por parte de COX-1 y COX-2.

COX-1 y COX-2 son homodímeros con una masa molecular aproximada de 70 kDa por monómero, y están formados por unos 600 residuos de aminoácidos. Ambas comparten cerca del 60% de su secuencia peptídica.^{38,39} Son enzimas bifuncionales, con acción ciclooxigenasa y peroxidasa. El centro activo ciclooxigenasa se encuentra localizado al final de un largo canal hidrofóbico cerca del amplio dominio de unión y se estrecha a medida que se interna en la proteína. Una constricción formada por los residuos de aminoácido Arg-120, Tyr-355 y Glu-524 separa el dominio de unión del centro activo ciclooxigenasa, situado sobre éste. El centro activo peroxidasa está situado en la superficie de la proteína, cerca del grupo hemo.

Aunque COX-1 y COX-2 son muy similares, existen diferencias importantes entre ambas. Entre ellas cabe destacar que el centro activo de COX-2 es alrededor de un 20% más grande que el de COX-1. Esto es debido a que en la posición 523 se encuentra un residuo de valina en COX-2, mientras que en COX-1 existe un residuo de isoleucina. Este aumento en el volumen del centro activo de COX-2 hace que sea una

enzima con más tendencia a interactuar con ácidos grasos de distinto tamaño de cadena.⁴⁰ Por ejemplo, COX-2 es capaz de interactuar con el AA incluso habiendo sido acetilada por la aspirina, mientras que COX-1 es incapaz de hacerlo.⁴¹ Por otra parte, la selectividad que poseen algunos fármacos con COX-2 (como los coxibs: rofecoxib, celecoxib, etc.) son debidas a esta cavidad extra en el centro activo de la enzima, que permite la entrada y la interacción selectiva de éstos. Otra diferencia importante viene dada por la existencia de un residuo de isoleucina en la posición 434 de COX-1, mientras que en COX-2 existe un residuo de valina. Esto permite que en COX-2 se extienda la entrada al centro activo, cosa que está impedida en COX-1 por el mayor tamaño de la isoleucina.³⁹ Esto también favorece la unión con los coxibs.

La naturaleza de las interacciones que tienen lugar entre fármacos y COX son generalmente de tipo electrostático, por puente salino o puente de hidrógeno. Kurumbail y *col.* describen de forma detallada cómo el flurbiprofeno (AINE de la familia de los ácidos 2-arilpropiónicos) se une a COX. Los residuos de aminoácido que participan de una forma más activa en estas interacciones son principalmente el residuo de Arg-120 y el de Tyr-355, entre otros. El flurbiprofeno (FBP), al ser un fármaco no selectivo de las ciclooxigenasas, inhibe tanto a COX-1 como a COX-2, impidiendo la entrada del ácido araquidónico en su centro activo. Como ya se ha comentado con anterioridad, esta inhibición de COX-1 es la causa de que estos fármacos generen efectos gastrointestinales adversos en el organismo.

La Figura 1.7 muestra de forma esquemática cómo el FBP interacciona en el centro activo de ambas ciclooxigenasas, indicándose, además, los aminoácidos que tienen mayor relevancia en la interacción del fármaco con la enzima (Tyr-355 y Arg-120).

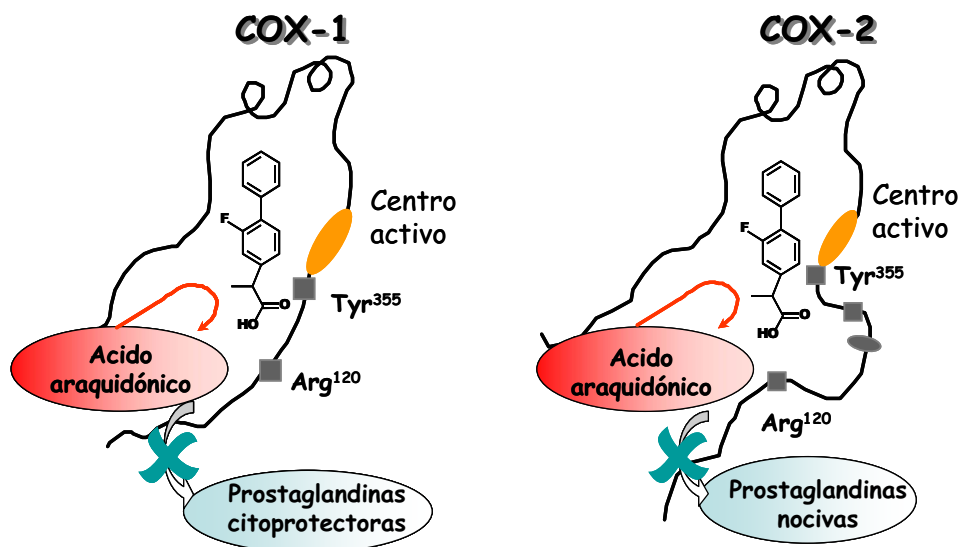


Figura 1.7. Mecanismo de inhibición de las ciclooxigenasas 1 y 2 por interacción con flurbiprofeno.

En la formación del complejo FBP-COX, el grupo carboxilato del fármaco interacciona con el grupo guanidino de la Arg-120 mediante un puente salino. Además, también forma un enlace de hidrógeno con el fenol de la Tyr-355. Asimismo, existen interacciones de tipo van der Waals entre los anillos del fármaco y residuos de aminoácido como Tyr-385, Gly-526, Ala-527 y Val-349; ³⁹ todas ellas se muestran en la Figura 1.8.

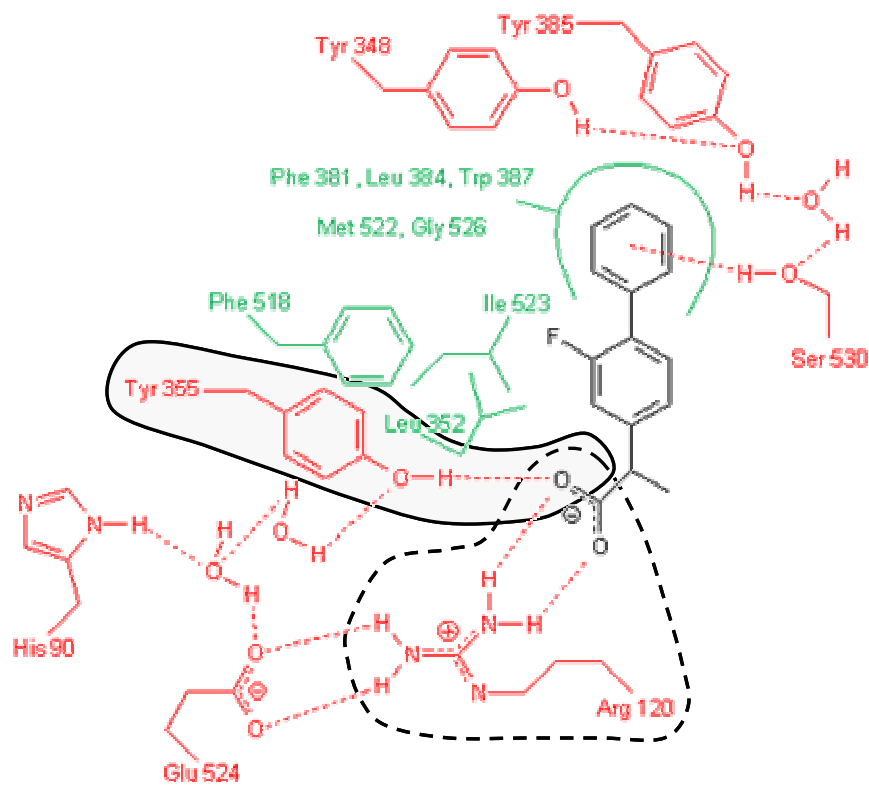


Figura 1.8. Interacción entre el flurbiprofeno y los residuos de aminoácido tirosina-355 y arginina-120 en el centro activo de COX-1.

1.2.3. Lipasas

Las lipasas son un tipo de enzimas ampliamente distribuidas en la Naturaleza. Pueden ser aislados de animales, plantas y microorganismos. Su función es la de catalizar la hidrólisis reversible de triacilglicéridos de grasas animales y de aceites vegetales, para dar lugar a ácidos grasos y glicerol.⁴² Este proceso se muestra de forma esquemática en la Figura 1.9.

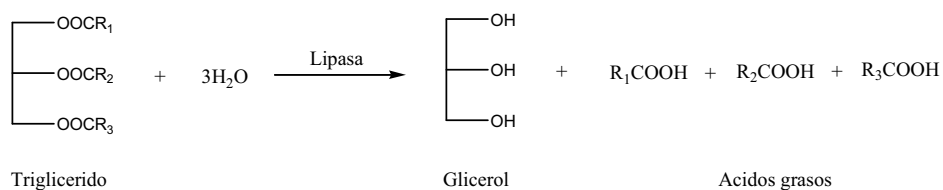


Figura 1.9. Hidrólisis de triacilglicéridos de grasas catalizada por lipasa.

Las lipasas son activas únicamente cuando están adsorbidas sobre una interfase lípido-acuosa, fenómeno que recibe el nombre de “activación interfacial”. Su actividad catalítica se puede resumir en dos etapas.⁴³

1) *Activación interfacial*: en disolución acuosa, un segmento helicoidal de la cadena proteica, denominado “tapadera”, cubre el centro activo de la lipasa. En presencia de una interfase o en un medio orgánico, la tapadera se abre, lo que provoca un cambio total en la superficie de entrada al centro activo, de manera que se vuelve más hidrofóbica y se favorece la interacción del enzima con el sustrato.

2) *Hidrólisis del enlace éster del sustrato*: tiene lugar a través de varios pasos, en los que juegan un papel fundamental los aminoácidos histidina y serina.

Las lipasas tienen numerosas aplicaciones en la industria alimentaria, química y farmacéutica. En Química Orgánica, el mayor interés de las lipasas radica en su aplicación para la síntesis de compuestos óptimamente activos mediante la hidrólisis o síntesis enantioespecífica de ésteres, en las que el residuo de histidina parece jugar un papel clave.⁴⁴ Este proceso tiene especial interés para el caso de los ácidos 2-arilpropiónicos.

Las lipasas se suelen aislar de diversos microorganismos, plantas y animales. De entre ellas, las lipasas microbianas son las que han suscitado un mayor interés, ya que son fácilmente accesibles y tienen aplicaciones de tipo industrial y médico. La lipasa de *Cándida rugosa* se aisló por primera vez en 1962 de suelos naturales. Existen cinco formas isoenzimáticas de lipasa *Cándida rugosa*. En todas ellas las regiones que comprenden los residuos 62-91 y 283-297 constituyen la “tapadera” que cubre el centro activo de la lipasa, donde se sitúa la tríada catalítica Ser 209, Glu 341 e His 449.⁴⁵

Parte II: Antiinflamatorios no esteroideos

1.3. Perspectiva histórica

Desde la época de la medicina griega hasta la mitad del siglo XIX el descubrimiento de agentes medicinales fue catalogado como un arte empírico, donde se combinaron folklore y creencias mitológicas para la utilización de productos vegetales y minerales constituyentes de la farmacopea de la época.

Ya en el siglo V a.C., Hipócrates usó el extracto de la corteza y las hojas de sauce para el tratamiento del dolor y el control de la fiebre. Celsius (año 30 a.C.) describió los signos de inflamación (enrojecimiento, fiebre, dolor e hinchazón) y utilizó la corteza de sauce para aliviarlos.⁴⁶ En 1763, el reverendo Edmund Stone inició el primer estudio clínico sobre los efectos del extracto de sauce como tratamiento antifebril, presentando los resultados obtenidos ante la *Royal Society* en Londres.⁴⁷

El ingrediente activo de la corteza de sauce se debe a la salicina (1828, Johan Andreas Buchner), un glucósido que por hidrólisis libera glucosa y alcohol salicílico. Éste puede ser convertido, tanto *in vivo* como por manipulación química, en ácido salicílico (antecedente de la aspirina), el cual posee propiedades analgésicas y antiinflamatorias. En 1859 Kolbe sintetiza por primera vez el ácido salicílico, y es en 1897 cuando Félix Hoffmann descubrió el ácido acetilsalicílico, principio activo de la aspirina, que posee propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias.

Tras el descubrimiento de la aspirina se impulsó el desarrollo de nuevos fármacos de la familia de los antiinflamatorios no esteroideos (AINES). A partir de la segunda mitad del siglo XX surgen fármacos

como la indometacina (1960), el ibuprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, carprofeno, benoxaprofeno y otros derivados de los ácidos 2-arilpropiónicos (1970-80), el meloxicam, rofecoxib, celecoxib, etc (1990).

1.4. Actividad farmacológica de los AINES

Los AINES constituyen uno de los grupos de fármacos más prescritos en la actualidad. Aproximadamente, a nivel mundial, unos 30 millones de personas consumen diariamente AINES. En España se prescribían hace una década más de 27 millones de envases anuales de estos fármacos.

Los AINES son un grupo de fármacos que poseen actividad antipirética y analgésica cuando son consumidos en dosis bajas y durante cortos períodos de tiempo, utilizándose para el tratamiento del dolor leve-moderado. Además, poseen actividad antiinflamatoria cuando son consumidos en dosis mayores y de forma continuada, siendo utilizados para el tratamiento sintomático del dolor y la inflamación en diversas enfermedades como artritis reumatoide, artrosis y otras dolencias. Sin embargo, aunque los efectos beneficiosos en el consumo de AINES son notables, también generan efectos adversos en el organismo cuando son consumidos de forma continuada, los cuales pueden llegar a ser graves; entre ellos cabe destacar: fallo renal, anemia, hepatitis, daño gastrointestinal (formación de úlceras), hemorragias digestivas y perforación.⁴⁸ La aparición de estos efectos secundarios conduce a la hospitalización de un gran número de pacientes. Por ejemplo, en EEUU se producen más de 100 mil hospitalizaciones graves cada año relacionadas con el daño

gastrointestinal; alrededor de un 10% de estos pacientes hospitalizados mueren.⁴⁹

1.4.1. Prostaglandinas: inflamación y dolor

La inflamación es una respuesta de carácter protector contra agentes agresores. Las manifestaciones clínicas de la inflamación se producen por los llamados mediadores químicos. Entre estos destacan la histamina, la bradiquinina, el factor activador de plaquetas y los derivados del ácido araquidónico (AA), conocidos como eicosanoides, a los que pertenecen las familias de prostaglandinas (PGs), prostaciclina, tromboxanos (TXs) y leucotrienos (LTs).⁵⁰ Bajo estímulos fisiológicos y en concentraciones normales, las prostaglandinas regulan numerosas funciones como la coagulación, el metabolismo óseo, el desarrollo y crecimiento del sistema nervioso, la citoprotección de la mucosa gástrica, etc. Sin embargo, también juegan un papel importante en procesos patológicos como el cáncer, artritis y Alzheimer, entre otros.^{51,52}

El ácido araquidónico proviene del ácido linoleico de los alimentos o se ingiere como parte de la dieta, y se encuentra esterificado a los fosfolípidos de membrana. Frente a una agresión externa se activa la fosfolipasa A2, la cual hidroliza el enlace éster de los fosfolípidos, originando la ruptura de la membrana celular con la consiguiente liberación de los mediadores del dolor histamina, bradiquinina y AA. Este último, por acción de la enzima ciclooxigenasa (COX) genera prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos, y por la vía lipooxigenasa genera leucotrienos, todos ellos mediadores de la inflamación. En la Figura 1.10 se muestra esquemáticamente este proceso.

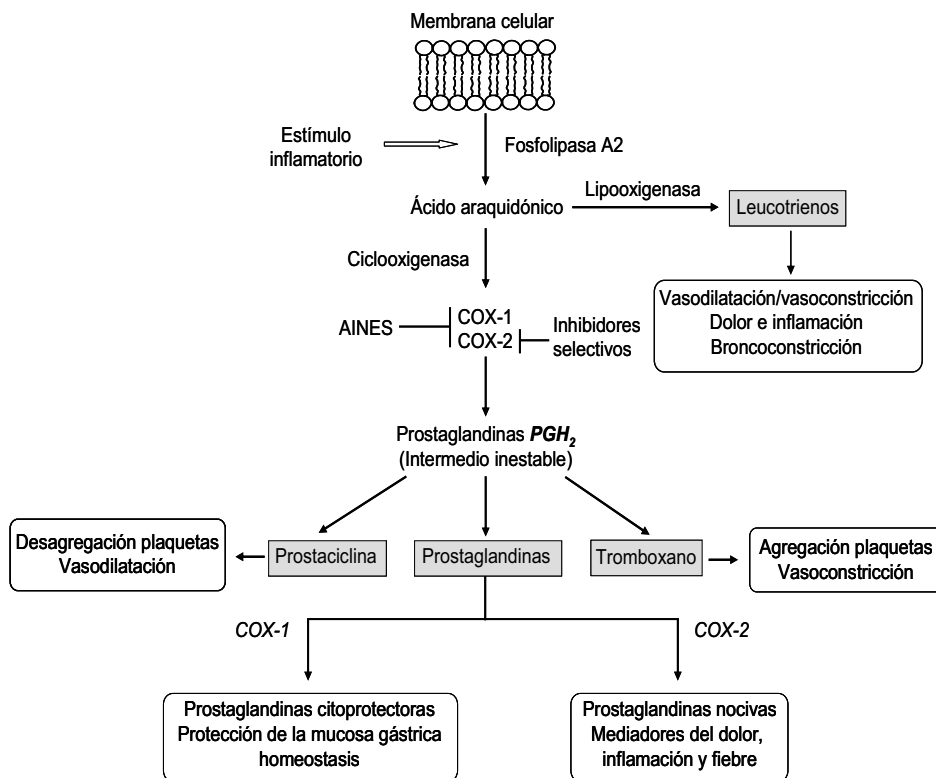


Figura 1.10. Mecanismo de formación de prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos a partir de la cascada del ácido araquidónico.

1.4.2. Mecanismo de acción de los AINES

El mecanismo principal de acción de los AINES está relacionado con la inhibición de la enzima COX, responsable de la síntesis de PGs a partir del AA.⁵³ Se ha comentado anteriormente que existen dos isoformas de COX, la COX-1 y la COX-2. La primera es responsable de la síntesis de PGs y TXA_2 con propiedades citoprotectoras, mientras que COX-2 es la principal responsable de la síntesis de prostaglandinas dañinas para el organismo. Por esta razón, se cree que los efectos

adversos gastrointestinales derivados por el consumo de AINES no selectivos de COX son producidos por la inhibición de COX-1, mientras que sus propiedades como antiinflamatorios se deben a la inhibición de COX-2 (Figura 1.11).

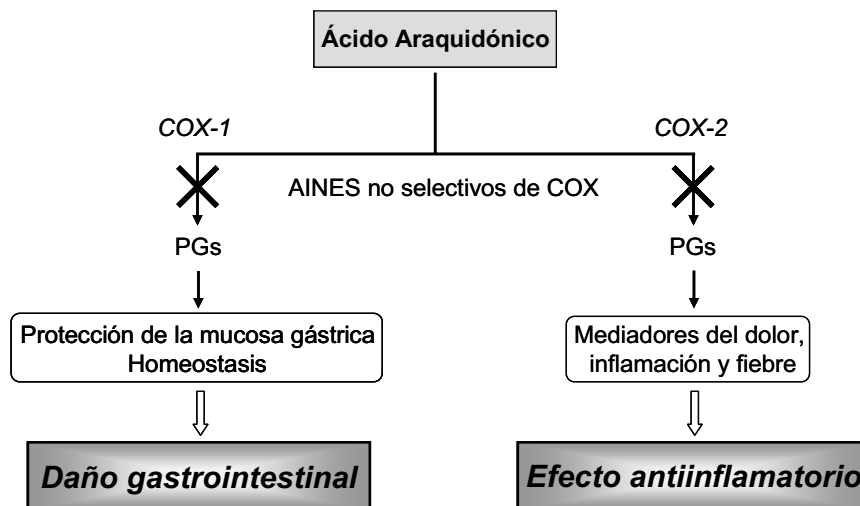


Figura 1.11. Mecanismo general de inhibición de COX-1 y COX-2 por acción de AINES no selectivos de COX.

1.4.3. Los AINES como inhibidores de COX

Los inhibidores de las ciclooxigenasas se pueden clasificar en cuatro tipos:

1- Los que inhiben de forma irreversible tanto a COX-1 como a COX-2, como por ejemplo la aspirina, que produce la acetilación selectiva del grupo hidroxilo de un residuo de serina en la posición 530 en ambas isoenzimas.⁵⁴

2- Aquellos que producen una inhibición competitiva reversible de ambas isoformas. El ibuprofeno o el mefenamato forman parte de este grupo.

3- Los que llevan a cabo una inhibición lenta y dependiente con el tiempo de COX-1 y COX-2. Ejemplo de éstos son los derivados de los ácidos 2-arilpropiónicos (como el **flurbiprofeno**) y la indometacina.⁵⁵

4- Finalmente, los que dan lugar a una inhibición selectiva de COX-2 en un proceso lento y dependiente del tiempo. En este grupo se encuentran los coxibs, como celecoxib, rofecoxib, etc.⁵⁶

1.5. Ácidos 2-arilpropiónicos

Los ácidos 2-arilpropiónicos son fármacos antiinflamatorios no esteroideos de uso común para el tratamiento de la inflamación, fiebre, dolor asociado a la artritis reumatoide, osteoartritis, daños leves en los tejidos, como tendinitis y bursitis, prevención de migrañas, etc.⁵⁷⁻⁵⁹

La estructura general de estos fármacos se muestra en la Figura 1.12. Poseen un grupo Ar que puede ser de distinta naturaleza (naftaleno, bifenilo, benzofenona, benzoiltiofeno, etc) y otra parte propiónica con un centro quiral que puede ser (S)- o (R)-.

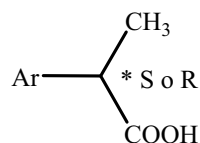


Figura 1.12. Estructura general de los ácidos 2-arilpropiónicos.

Generalmente, el enantiómero (S)- es el farmacológicamente activo.⁶⁰ Algunos de estos fármacos son capaces de absorber la luz solar y de inducir la producción de reacciones fototóxicas y fotoalérgicas, generando daños en la piel.⁶¹ Los síntomas clínicos de fototoxicidad incluyen quemaduras de la dermis, eritema, edema, hiperpigmentación, descamación, etc.⁶²

En la Figura 1.13 se muestran las estructuras químicas de algunos fármacos de la familia de los ácidos 2-arilpropiónicos. Entre ellos se destaca el flurbiprofeno (FBP), objeto de estudio en esta tesis doctoral.

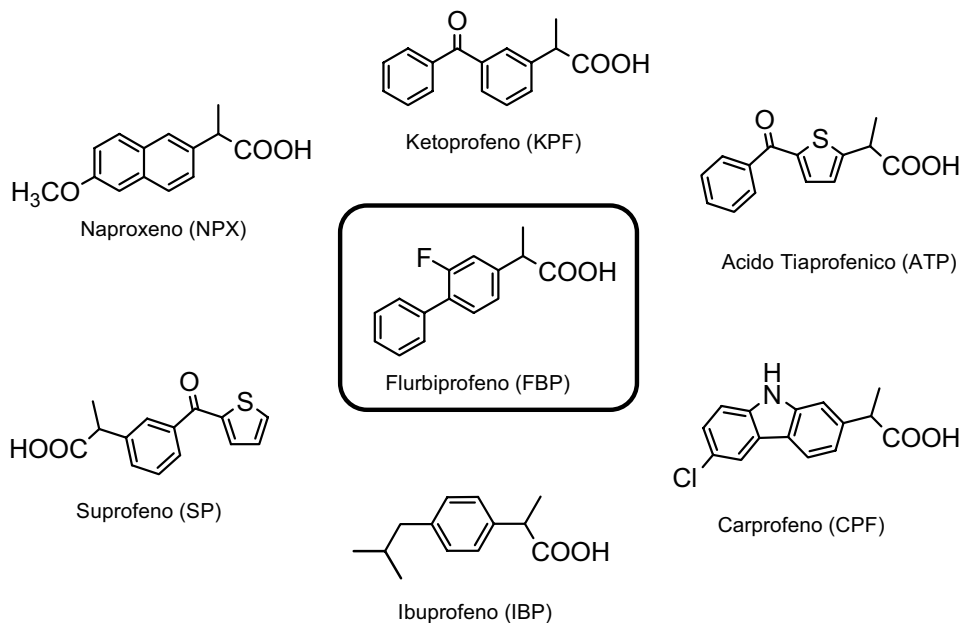


Figura 1.13. Estructura química de algunos fármacos pertenecientes a la familia de los ácidos 2-arilpropiónicos.

1.5.1. Efectos secundarios fotosensibilizados

Algunos fármacos derivados de los ácidos 2-arilpropiónicos tienen la capacidad de absorber la luz solar, pudiendo generar especies transitorias, radicales o favorecer la formación de fotoproductos. Cualquiera de estas especies podría interactuar con biomoléculas generando fototoxicidad. Estas observaciones se han realizado *in vivo*, y en algunos casos en humanos.⁶²

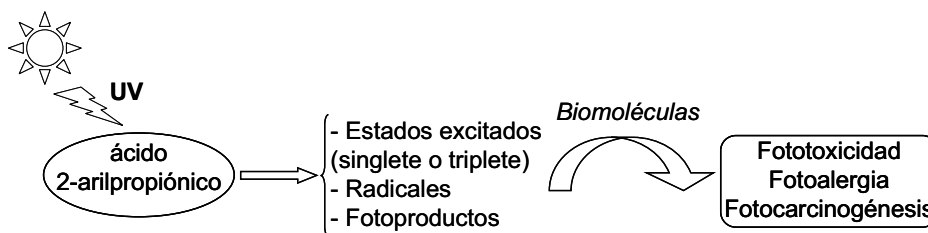


Figura 1.14. Efectos indeseados generados por los derivados de los ácidos 2-arilpropiónicos tras la absorción de luz solar.

Estudios realizados al irradiar estos fármacos en un cultivo celular muestran sus efectos fototóxicos. Entre éstos cabe destacar la fotohemólisis de glóbulos rojos y la reducción de la actividad enzimática intracelular de la enzima lactato deshidrogenasa, útil para cuantificar la fototoxicidad de estos fármacos en cultivos de hepatocitos y fibroblastos.^{63,64}

De forma alternativa, se pueden llevar a cabo estudios fototóxicos por irradiación del fármaco con la biomolécula aislada. En este caso se pueden observar distintos procesos, entre los que cabe destacar la fotoperoxidación de ácidos grasos insaturados (principalmente del ácido linoleico) como indicador del daño a la membrana celular, el daño al ADN, bien por rotura de la doble cadena, por formación de dímeros de timina o por fotooxidación de las bases, etc, y modificaciones fotosensibilizadas de proteínas, como las albúminas séricas, donde se puede fotosensibilizar un enlace covalente con éstas, pudiéndose alterar de esta forma tanto la función farmacológica del fármaco como la función de la proteína.^{65,66}

1.5.2. Mecanismo de la fotosensibilización

La fototoxicidad de los derivados propiónicos es debida a que bien el fármaco o el fotoproducto que pueda generar puedan dar lugar a especies transitorias que interaccionen con biomoléculas.

Los fotoproductos que principalmente generan los derivados de los ácidos 2-arilpropiónicos son productos de fotodescarboxilación, formando radicales que pueden interaccionar siguiendo distintos caminos: reacción con el disolvente, dimerización, oxidación y deshalogenación, cuando sea posible.

Las especies transitorias generadas pueden interaccionar con las biomoléculas a través de dos mecanismos.⁶⁷

- *Tipo I*: el fármaco, en el estado excitado, induce un proceso de transferencia de carga, hidrógeno o de energía en la biomolécula, ocasionando diferentes tipos de lesiones donde el oxígeno también puede participar de una forma indirecta.

- *Tipo II*: se produce una transferencia de energía desde el estado excitado del fármaco al oxígeno molecular, generándose oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). Éste es un agente oxidante muy potente que puede reaccionar con numerosas moléculas biológicas. Este proceso tendrá lugar cuando la energía del estado excitado involucrado sea mayor que la del oxígeno singlete y cuando su tiempo de vida sea suficientemente largo para poder reaccionar.

1.6. Antecedentes bibliográficos

El conocimiento de las interacciones fármaco/proteína es fundamental para comprender la biodistribución, el metabolismo, la eliminación y el efecto farmacológico de los fármacos en el organismo. El número de técnicas utilizadas para la realización de este tipo de estudios es muy amplio y variado. Entre las más destacadas se encuentran: dicroísmo circular, ultracentrifugación, diálisis de equilibrio, cromatografía líquida, electroforesis capilar, cristalografía de rayos X, fluorescencia por desactivación del Trp, etc. El uso de estas técnicas ofrece ventajas, pero también algunos inconvenientes y limitaciones.^{68,69}

Algunos de los métodos más frecuentemente utilizados para estudiar las interacciones fármaco/proteína se describen brevemente: con el método de *ultracentrifugación* se puede determinar la masa molecular de una proteína, la estequiometría de formación de complejos macromoleculares, la afinidad de un sustrato por la macromolécula, etc. El fundamento de esta técnica se basa en la determinación de la velocidad de sedimentación de las macromoléculas, las cuales son sometidas a un campo centrífugo elevado tal que la fuerza de centrifugación es mayor que la de difusión, por lo que existe un transporte neto de materia hacia el fondo de la celda. Permite fraccionar las moléculas en base a las diferencias en coeficiente de sedimentación, que es función de la masa, densidad y la forma macromolecular. También es posible estudiar el equilibrio de sedimentación, donde las muestras se someten a campos centrífugos moderados hasta que se igualan las fuerzas opuestas de centrifugación y difusión. Esta permite realizar un análisis cuantitativo de las asociaciones que dan lugar a la formación de complejos macromoleculares. Sin embargo, en cuanto a las limitaciones que

implica el uso de esta técnica, se pueden indicar la del seguimiento de un procedimiento experimental complejo y laborioso, donde se requieren horas (15-24h) para la adquisición de datos de un único experimento. Además, se debe tener en cuenta un gran número de diversos factores a la hora de realizar un ensayo experimental, lo cual dificulta la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

La *electroforesis capilar* se utiliza generalmente para la separación de péptidos y proteínas. El fundamento del mecanismo de separación se basa en la aplicación de un campo eléctrico donde la electroforesis se realiza en un tubo capilar, produciéndose una eficaz separación de los analitos basándose en la relación carga/masa de estos. Es una técnica de uso general, pero ofrece ciertos problemas de reproducibilidad.

En la bibliografía se encuentran muy pocos trabajos relacionados con el uso de la técnica de fotólisis de destello láser para estudiar las interacciones entre fármacos y proteínas. Ejemplo de ello son los estudios del fármaco carprofeno en ASH,⁷⁰ nabumetona en ASB,⁷¹ nafazolina en ASB⁷² o ketoprofeno en ASB.⁷³ La interacción del carprofeno (AINE perteneciente a la familia de los ácidos 2-arilpropiónicos) con ASH es uno de los primeros casos donde se observó una interacción estereoselectiva entre el estado excitado triplete del fármaco y la proteína.⁷⁰ Se observó que existe estereodiferenciación en diferentes procesos: 1) en la desactivación del estado excitado triplete del carprofeno, 2) en la formación del fotoproducto mayoritario del fármaco, que corresponde al producto de fotodeshalogenación, 3) en la formación de un enlace covalente fotoinducido con ASH, y 4) en la ocupación del sitio de unión de mayor afinidad del fármaco con la proteína (sitio II), donde el enantiómero (S)-se une más eficazmente a este sitio que su homólogo (R)-.

Parte III: Procesos fotoquímicos y fotofísicos

La fotoquímica molecular es la ciencia relacionada con la descripción física y química de los procesos que se derivan de la absorción de fotones.

Un proceso fotoquímico se inicia por 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, pasa a un estado electrónicamente excitado, el cual es inestable respecto al estado fundamental. La molécula excitada, si no modifica su estructura química mediante un proceso fotoquímico, buscará alguna otra forma de perder su energía para volver a su estado fundamental, dando lugar a un proceso fotofísico. Así pues, los distintos procesos por los cuales se puede producir la desactivación de una molécula al encontrarse en su estado excitado se pueden agrupar en dos: fotoquímicos y fotofísicos:⁷⁴

➤ Los **procesos fotoquímicos** son transformaciones que puede sufrir una molécula desde su estado electrónico excitado para dar lugar a estructuras de diferente constitución o configuración al estado inicial.

➤ Los **procesos fotofísicos** suponen un cambio en el estado cuántico de la molécula sin que se produzca ninguna modificación 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. Un proceso *radiante* implica la emisión de radiación electromagnética desde el estado electrónicamente excitado para regresar al estado electrónico fundamental. Sin embargo, en un proceso *no radiante*, la población del estado inicialmente excitado se transfiere a otro estado sin que le acompañe ninguna emisión.

Los procesos radiantes más comunes son:

- 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, $S_0 + h\nu \longrightarrow S_1$) o prohibidas (singlete-triplete, $S_0 + h\nu \longrightarrow T_1$) por la regla del espín.

- Fluorescencia (F): emisión permitida por la regla de espín, en la que se produce la desactivación de una especie excitada desde el primer estado excitado singlete al estado fundamental ($S_1 \longrightarrow S_0 + h\nu$) con la consiguiente emisión de un fotón de radiación. Esta emisión está caracterizada por una constante de velocidad k_F .

- Fosforescencia (P): emisión prohibida por la regla de espín, en la que se produce la desactivación de una especie excitada desde el primer estado excitado triplete al estado fundamental ($T_1 \longrightarrow S_0 + h\nu$) con la consiguiente emisión de un fotón. Esta emisión está caracterizada por una constante de velocidad k_P .

Entre los procesos no radiantes más comunes se encuentran:

- Conversión interna (CI): transiciones permitidas entre 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 CI está favorecida cuando dos niveles electrónicos son de energía similar. Ésta se caracteriza por una constante de velocidad k_{CI} .

- Cruce intersistemas (CIS): transiciones prohibidas entre estados de distinta multiplicidad (por ejemplo, $S_1 \rightarrow T_1$ o $T_1 \rightarrow S_0$), caracterizadas por una constante de velocidad k_{CIS} . Al igual que la conversión interna, la probabilidad de esta transición si los niveles vibracionales de los dos estados se solapan. El cruce intersistemas se ve favorecido en moléculas que contienen átomos pesados.

- Relajación vibracional (RV): transmisión de un exceso de energía de un nivel vibracional excitado a un nivel vibracional de menor energía.

Estos procesos se muestran en el diagrama de Jablonsky de la Figura 1.15. La duración de éstos se muestra en la Tabla 1.2.

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}

Tabla 1.2. Tiempos característicos de los principales procesos fotofísicos.

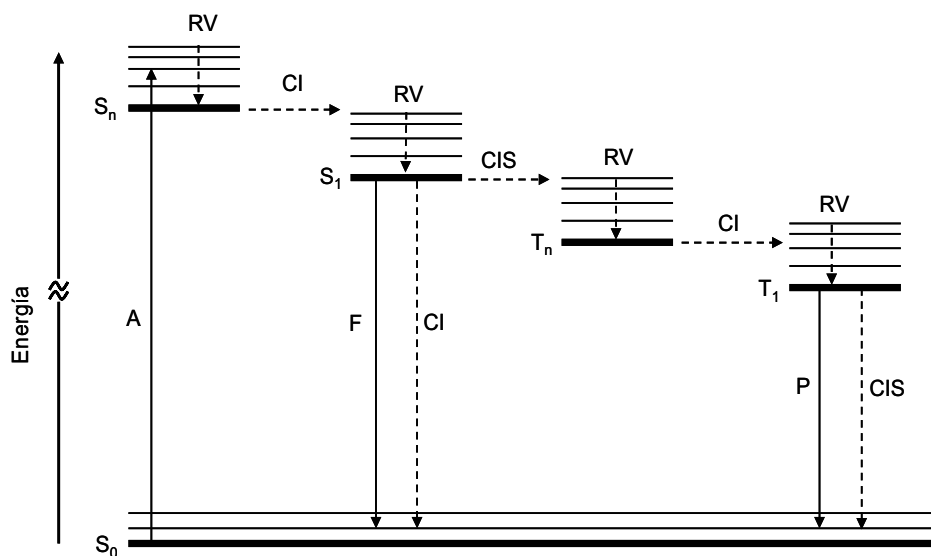
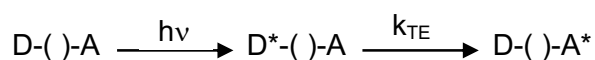


Figura 1.15. Diagrama de Jablonsky modificado, donde se encuentran representados los diferentes niveles de energía (S = singlete y T = triplete) y los procesos posteriores a la absorción de luz (**A**): **F** = fluorescencia; **P** = fosforescencia; **CI** = conversión interna; **CIS** = cruce intersistemas; **RV** = relajación vibracional. Las flechas continuas representan procesos fotofísicos radiantes y las discontinuas procesos no radiantes.

Por otra parte, cuando dos cromóforos se encuentran presentes en el mismo medio (unidos de forma covalente o no), pueden ocurrir entre ellos, de forma inducida por la luz, procesos como la transferencia de energía (TE), la transferencia electrónica (TEI), la formación de excíplejos (EX), la transferencia de protón o la formación de excímeros.

1.7. Transferencia de energía fotoinducida (TE)

En este proceso la energía de un cromóforo dador (D^*) en su estado excitado es transferida a otro cromóforo aceptor (A), produciéndose así la desactivación del dador a su estado fundamental (D) y la excitación del aceptor (A^*).



Para que este proceso ocurra, la energía del estado excitado del dador debe ser superior a la del aceptor (Ecuación 1.1), con un tiempo de vida suficientemente largo para poder reaccionar.

$$\Delta G \approx \Delta H = E_D^* - E_A^* \quad (1.1)$$

donde ΔG es la variación de la energía libre del proceso, E_D^* es la energía del estado excitado del dador y E_A^* es la energía del estado excitado del aceptor. Estos procesos generalmente tienen lugar siguiendo dos mecanismos: *coulómbico* (tipo Förster), o *intercambio electrónico* (tipo Dexter).⁷⁵ El primero implica una interacción dipolo-dipolo y actúa a largas distancias (de hasta 100 Å). Sin embargo, el mecanismo tipo Dexter requiere un solapamiento efectivo entre los orbitales del dador y el aceptor, teniendo lugar a distancias cortas (menores de 10 Å). En la Figura 1.16 se muestra esquemáticamente el mecanismo de estos procesos.

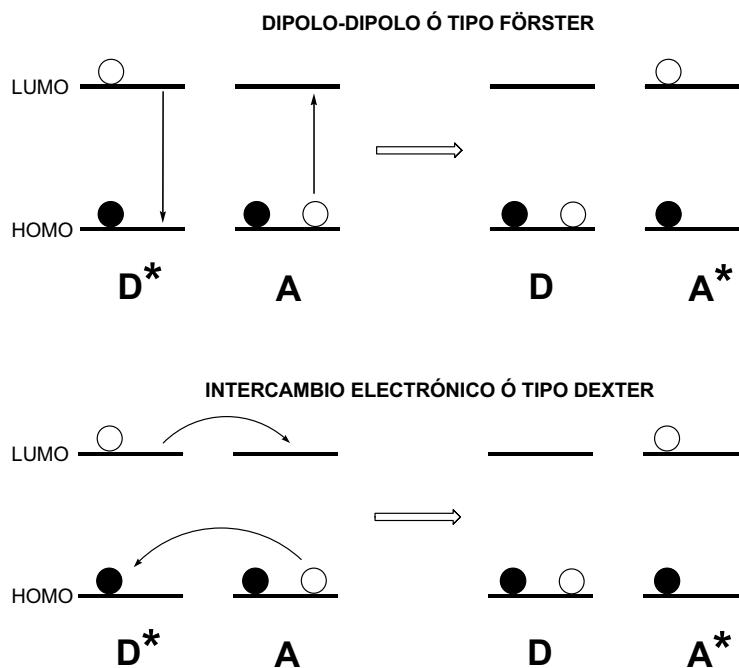


Figura 1.16. Mecanismos de transferencia de energía.

1.8. Transferencia electrónica y formación de exciplejos fotoinducidas

En general, el proceso de transferencia electrónica (TEI), tiene lugar cuando una molécula en su estado excitado cede un electrón a otra molécula en su estado fundamental. En ciertos casos, se puede formar un complejo de transferencia de carga entre un cromóforo (D^*) en su estado excitado y otro cromóforo distinto (A) en su estado fundamental. Este complejo, llamado exciplejo (EX), posee carácter de carga parcial en cada cromóforo y un elevado momento dipolar.

La termodinámica de estos procesos se puede determinar haciendo uso de la ecuación de Rehm-Weller^{76,77} (Ecuación 1.2).

$$\Delta G = E_{ox} - E_{red} - E_{0-0} + C \quad (1.2)$$

donde ΔG es la variación de la energía libre del proceso, E_{ox} y E_{red} son los potenciales de oxidación y reducción en el estado fundamental de dador y aceptor, E_{0-0} es la energía del estado excitado implicado, y C es el término coulombico que tiene en cuenta la estabilización de las especies generadas en el disolvente empleado. En disolventes polares se estabiliza el par iónico radicalario generado por transferencia electrónica, mientras que en disolventes apolares está favorecida la formación de exciplexo (Figura 1.17). Los exciplejos pueden detectarse haciendo uso de la técnica de fluorescencia.

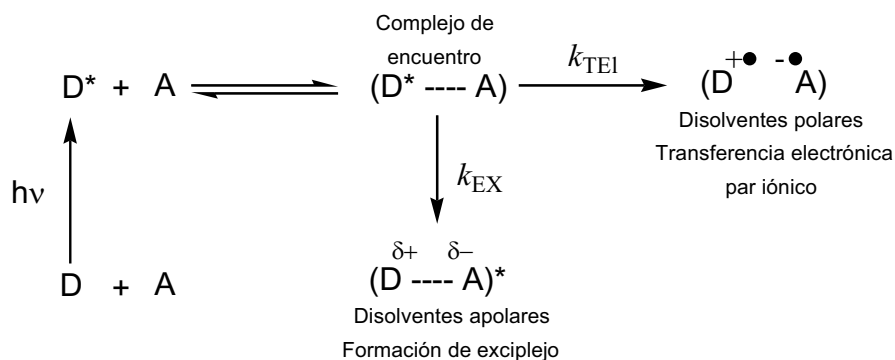
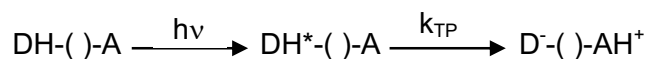


Figura 1.17. Mecanismo de transferencia electrónica.

1.9. Transferencia de protón fotoinducida (TP)

En la transferencia de protón fotoinducida, el dador (D) transfiere un protón al aceptor (A). Este proceso puede ocurrir indistintamente por excitación de D o de A.



o bien

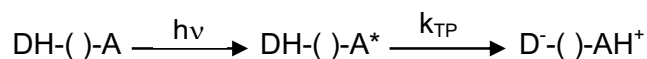


Figura 1.18. Proceso de transferencia de protón, bien por excitación del dador o del aceptor.

1.10. Formación de excímero

Un excímero es un complejo que se forma entre un cromóforo en su estado excitado con otro cromóforo idéntico en su estado fundamental. Como ocurría en el caso de los exciplejos, también los excímeros (EXC) pueden ser detectados haciendo uso de la técnica de fluorescencia.^{78,79}

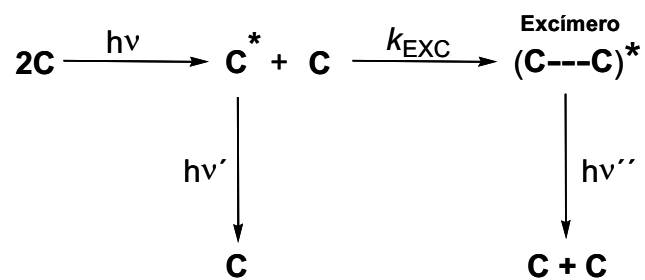


Figura 1.19. Proceso de formación de excímero para un cromóforo C.

En los excímeros no existe una separación de carga como ocurre con los exciplejos. Los excímeros tienen propiedades electrónicas iguales.

1.11. Referencias bibliográficas

1. Barrett, G. C.; Davies, J. S. *Amino Acids, Peptides and Proteins*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2004**; Vol. 34.
2. Petsko, G., Ringe, D. **2003**. *Protein Structure and Function*. Blackwell Publishing.
3. Branden, C., Tooze, J. **1999**. *Introduction to Protein Structure*. Taylor and Francis eds.
4. Peters, T. *Adv. Protein Chem.* **1985**; 37: 161.
5. Peters, T. *All About Albumin; Biochemistry, Genetics and Medical Applications*, Academic Press, **1995**.
6. Israili, Z. H. *Drug Metabolism Review.* **2001**; 33: 161.
7. Yamada, H., Shimizu, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1988**; 27: 622.
8. Wong, C. H. *Science.* **1989**; 244: 1145.
9. Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., Kobayashi, K. *Protein Eng.* **1999**; 12: 439-446.
10. Dockal, M., Carter, D. C., Ruker, F. *J. Biol. Chem.* **1999**; 274: 29303.
11. Kragh-Hansen, U., Chuang, V. T. G., Otagiri, M. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**; 25: 695-704.
12. Ewaskiewicz, J. I., Devlin, T. M., Ch'ih, J. *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**; 179: 1095-1100.
13. Drmanovic, Z., Voyatzi, S., Kouretas, D., Sahpazidou, D., Papageorgiou, A., Antonoglou, O. *Anticancer Res.* **1999**; 19: 4113-4124.
14. Agarwal, R. P., Phillips, M., McPherson, R. A., Hensley, P. *Biochem. Pharmacol.* **1986**; 35: 3341-3347.
15. Georges, S. H., Presle, N., Buronfosse, T., Fournel-Gigleux, S., Magdalou, J., Lopicque, F. *Chirality.* **2000**; 12: 53-62.

16. Dubois-Presle, N., Lapicque, F., Maurice, M. H., Fournel-Gigleux, S., Magdalou, J., Abiteboul, M., Siest, G., Netter, P. *Mol. Pharmacol.* **1995**; 47: 647-653.
17. 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**, pp. 173-180.
18. He, K. M., Carter, D. C. *Nature.* **1992**; 358: 29.
19. Carter, D. C., Ho, J. X. *Adv. Protein Chem.* **1994**; 45: 153-203.
20. Curry, S. et al, *Nat. Struct. Biol.* **1998**; 5: 827-835.
21. Ferrer, M., Duchowicz, R., Carrasco, B, Garcia de la Torre, J., Acuña, A. U. *Biophys. J.* **2001**; 80: 2422-2430.
22. Hirayama, K., Akashi, S., Furuya, M., and Fukuhara, K. I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**; 173: 639.
23. Keire, D. A., Mariappan, S. V., Peng, J., Rabenstein, D. L. *Biochem. Pharmacol.* **1993**; 46: 1059-1069.
24. Sudlow, G., Birkett, D. J., Wade, D. N. *Mol. Pharmacol.* **1976**; 12: 1052.
25. Lapicque, F., Muller, N., Payan, E., Dubois, N. *Clin. Pharmacokinet.* **1993**; 25: 115.
26. Rahman, M. H., Yamasaki, K., Shin, Y.-H., Lin, C. C., Otagiri, M. *Biol. Pharml. Bull.* **1993**; 16: 1169.
27. Bhattacharya, A. A., Curry, S., Franks, N. P. *J. Biol. Chem.* **2000**; 275: 38731-38738.
28. Bhattacharya, A. A., Grüne, T., Curry, S. *J. Mol. Biol.* **2000**; 303: 721-732.
29. Menke, G., Wörner, W., Kratzer, W., Rietbrock, N. *Arch. Pharmacol.* **1989**; 339: 42.
30. Kragh-Hansen, U. *Dan. Med. Bull.* **1990**; 37: 57-84.

31. Rahman, M. H., Maruyama, T., Okada, T., Imai, T., Otagiri, M. *Biochem. Pharmacol.* **1993**; *46*: 1733-1740.
32. Rahman, M. M., Rahman, M. H., Rahman, N. N. *Pakistan J. Pharm. Sci.* **2005**; *18*: 43-47.
33. Fu, J., Masferrer, J., Seibert, K., Raz, A., Needleman, P. J. *Clin. Inves.* **1990**; *86*: 1375-9.
34. Xie, W., Chipman, J. G., Robertson, D.L. et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **1991**; *88*: 2692-6.
35. Crofford, L. J. *J. Rheumatol.* **1997**; *24*: 15-19.
36. Hla, T. and Neilson, K. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **1992**; *89*: 7348-7388.
37. Crofford, L. J. et al. *J. Clin. Invest.* **1994**; *93*: 1095-1101.
38. Picot, D., Loll, P. J., Garavito, R. M. *Nature.* **1996**; *367*: 243-249.
39. Kurumbail, R. G., et al. *Nature.* **1996**; *384*: 644-648.
40. Otto, J. C., Smith, W. L. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* **1995**; *12*: 139.
41. Lecompte, M., Laneuville, O., Ji, C., DeWitt, D. L., Smith, W. L. *J. Biol. Chem.* **1994**; *269*: 13207-15.
42. Borgstrom, B., Brockman, H. L. Eds. *Lipases*, Elsevier, **1984**.
43. Bzozowski, A. M., Derewenda, V., Derewenda, Z. S., Dodson, G., Lawson, D. M., Turdemburg, J. P., Bjorling, F., Hugel-Jensen, B., Datkar, S. A., Thim, L. *Nature.* **1991**; *351*: 491.
44. Wong, C. H., Whitesides, G. M. en *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Tetrahedron organic Chemistry Series, Vol. 12, Baldwin J. E y Magnus P. D. Eds., Elsevier, Sci. Pub. Oxford. **1994**; 71.
45. Longhi, S., Fussetti, F., Grandori., Lotti, M. Vanoni, M., albergina, L. *Biochim. Biophys. Acta.* **1992**; *227*: 1131.
46. Vane, J. and Botting, R. M. *FASEB. J.* **1987**; *1*: 89-96.
47. Stone, E. *Philos. Trans. R. Soc. London.* **1763**; *53*: 195-200.
48. Gibson, T. *J. Rheumatol.* **1990**; *27*: 87- 90.

49. Silverstein, F. E. *Dig. Dis. Sci.* **1998**; 43: 447-458.
50. Smith, T., McCrackens, J., Shin, Y.-K, DeWitt, D. *J. Biol. Chem.* **2000**; 275: 40407-40415.
51. Vane, J. R., Bakhle, Y. S., Botting, R. M. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1998**; 38: 97-120.
52. Bakhle, Y. S., Botting, R. M. *Mediators. Inflamm.* **1996**; 5: 305-323.
53. Vane, J.R. *Nat. New. Biol.* **1971**; 231: 232-235.
54. Roth, G. J., Standford, N. and Majerus, P. W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **1975**; 72: 3073-3076.
55. Kulmacz, R. J. and Lands, W. E. M. *J. Biol. Chem.* **1985**; 260: 12572-12578.
56. Gierse, J. K. et al. *J. Biol. Chem.* **1996**; 271: 15810-15814.
57. Rovensky, J., Micekova, D. *Drug. Exp. Clin. Res.* **2000**; 26: 19-24.
58. Bellamy, N., Bensen, W. G., Ford, P. M., Huang, S. H., Lang, J. Y. *Clin. Invest. Med.* **1992**; 15: 427-433.
59. Muckle, D. S. *Am. J. Med.* **1986**; 80: 76-80.
60. Greig, M. E., Griffin, R. L. *J. Med. Chem.* **1975**; 18: 112-116.
61. Miranda, M. A. *Academic Press, San Diego.* **1997.** 289-315.
62. Boscá, F. and Miranda, M. A. *J. Photochem. Photobiol B: Biol.* **1998**; 43: 1-26.
63. Chignell, C. F. and Sik, R. H. *Photochem. Photobiol.* **1995**; 62: 205-207.
64. Ljunggren, B. *Photodermatol.* **1985**; 2: 3-9.
65. Artuso, T., Bernadou, J., Meunier, B., Piette, J., Paillous, N. *Photochem. Photobiol.* **1991**; 54: 205-213.
66. Miranda, M. A., Castell, J. V., Gómez-Lechón, M. J., Hernandez, D., Martinez, L. A. *Toxicology in Vitro.* **1995**; 9: 499-503.
67. Boscá, F., Marín, M. L., Miranda, M. A., *Photochem. Photobiol.* **2001**; 74: 637-655.

68. Jia, Z., Ramstad, T., Zhong, M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**; 405: 413.
69. Lucas, L. H., Price, K. E., Larive, C. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**; 126: 14258.
70. Lhiaubet-Vallet, V., Sarabia, Z., Boscá, F., Miranda, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**; 126: 9538.
71. Martínez, L. J., Scaiano, J. C. *Photochem. Photobiol.* **1998**; 68: 646.
72. Sortino, S., Scaiano, J. C., Giuffrida, S. *New. J. Chem.* **1999**; 23: 1159.
73. Monti S., Manet, I., Manoli, F., Morrone, R., Nicolosi, G., Sortino, S. *Photochem. Photobiol.* **2006**; 82: 13.
74. Turro, N. J., *Modern Molecular Photochemistry*. University Science Books: Sausalito, California, **1991**.
75. Speiser, S. *Chem. Rev.* **1996**; 96: 1953.
76. Rehm, D.; Weller, A. *Isr. J. Chem.* **1970**; 8: 259.
77. Weller, A. *Z. Phys. Chem. Neue Folge.* **1982**; 133: 93.
78. Birks, J. B. *Photophysics of Aromatic Molecules*. Wiley. New York. **1970**.
79. Birks, J. B., Christophorou, L. G. *Nature.* **1962**; 194: 442.

CAPÍTULO 2. Objetivos y metodología

2.1. Objetivo general

El objetivo del presente trabajo consiste en el desarrollo y puesta a punto de una nueva metodología que proporcione información sobre las interacciones que existen entre sustratos y proteínas. Como sustratos se utilizarán el flurbiprofeno y su éster metílico; en cuanto a las proteínas, se centrará la atención en las albúminas séricas humana y bovina. Para ello se va a hacer uso de las técnicas de fotólisis de destello láser y de fluorescencia. Se estudiarán las especies transitorias generadas tras absorción de luz, utilizándose las propiedades de los estados excitados del fármaco como parámetros cuantitativos sensibles a las características del medio.

El estudio de estos estados excitados proporcionará información relevante relacionada con la naturaleza de la interacción fármaco/proteína, así como en la caracterización de los sitios de unión de proteínas transportadoras, determinante para la actividad farmacológica.

La técnica de fotólisis de destello láser es muy sensible, capaz de detectar las especies transitorias que genera el sustrato por absorción de luz a concentraciones muy bajas (de hasta 10^{-6} M). El procedimiento experimental seguido al hacer uso de esta técnica es sencillo y de rápida ejecución. Además, ofrece resultados altamente reproducibles y de fácil procesado.

Las propiedades que se miden con esta técnica están relacionadas con los estados excitados de las muestras a estudiar, los cuales se van a usar como sonda para el estudio de la interacción y distribución de fármacos en proteínas. Así pues, los tiempos de vida de los tripletes pueden proporcionar información sobre la naturaleza y fuerza de enlace, la existencia de restricciones conformacionales,

requerimientos estereoquímicos, protección frente al ataque de O₂ y otros reactivos, etc.

2.2. Objetivos concretos y metodología

Entre los *objetivos concretos* propuestos en esta tesis, cabe destacar los siguientes:

- Estudiar los procesos fotofísicos que tienen lugar en sistemas en los que el fármaco se encuentra covalentemente unido a los aminoácidos del centro activo de la proteína que están más directamente implicados en la interacción. Estos modelos representan una simplificación frente a la situación real que permitiría conocer el mecanismo de interacción FBP-a.a. en ausencia del factor debido a la estructura terciaria de la proteína.

- Estudiar por FDL sistemas intermoleculares fármaco/proteína con el fin de intentar obtener información sobre la fuerza de la interacción y el porcentaje de fármaco unido a la proteína.

- Las formas enantioméricas (*S*)- y (*R*)- del flurbiprofeno son comerciales, lo que ofrece la posibilidad de estudiar la existencia de una posible estereodiferenciación en las interacciones FBP-a.a. y FBP/proteína.

Se ha escogido el antiinflamatorio no esteroideo flurbiprofeno por las siguientes razones:

- Su extendido uso en el mercado farmacológico para el tratamiento de procesos tan comunes como dolores leves, fiebre e inflamación.

- El bifenilo (cromóforo del FBP) es activo fotofísicamente, y las propiedades de sus estados excitados son conocidas.

- Existe un cierto número de trabajos previos relacionados con la interacción FBP/proteína, lo que puede ayudar a la validación del método propuesto.

La *metodología* que se va a seguir para el desarrollo de esta tesis doctoral consiste en la elaboración de sistemas cuya complejidad con respecto al sistema biológico fármaco/proteína vaya en aumento. En este sentido, el plan de trabajo comprende el estudio de los siguientes sistemas:

- *Sistemas intramoleculares*: diadas FBP-aminoácido. En ellos el fármaco está unido covalentemente al aminoácido del centro activo de la proteína que tiene mayor relevancia en la interacción con el fármaco. Como el FBP posee dos formas enantioméricas, se obtendrán ambos diastereómeros partiendo del fármaco enantioméricamente puro.

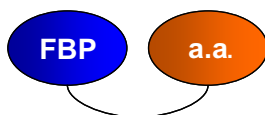


Figura 2.1. Sistema intramolecular FBP-aminoácido.

- *Sistemas supramoleculares* FBP/proteína y FBPMe/proteína. Se trata de sistemas donde sustrato y proteína se encuentran presentes en el mismo medio, con el fin de estudiar la interacción que se da entre ellos.

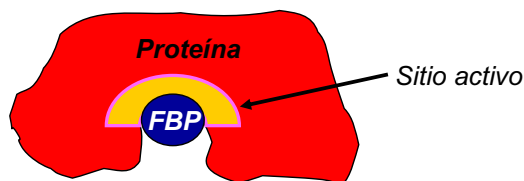


Figura 2.2. Sistema supramolecular FBP/proteína.

CAPÍTULO 3. *Caracterización de los estados excitados
del (S)-flurbiprofeno*

3.1. Introducción

El flurbiprofeno (FBP) es un antiinflamatorio no esteroideo de la familia de los ácidos 2-arilpropiónicos. En 1973 se sometió a evaluación por su función como inhibidor de la agregación plaquetaria.¹ Su nombre es ácido 2-(2-fluoro-1,1'-bifenil-4-il) propanoico, y su estructura química se muestra en la Figura 3.1. Posee actividad analgésica, antiinflamatoria y antipirética. Suele administrarse generalmente por vía oral, aunque también es posible hacerlo en forma de disoluciones salinas. Se elimina del organismo a través del hígado prácticamente en su totalidad pasadas 24h de su administración, en forma de distintos derivados hidroxilados en las diversas posiciones del grupo bifenilo.²

Su prescripción varía según los fines médicos, ya que se utiliza para el tratamiento de diversos procesos, como son la inflamación y el dolor causado por la artritis reumatoide,³ osteoartritis⁴ y daños leves en los tejidos (tendinitis y bursitis),⁵ prevención de migrañas,⁶ tratamiento de quemaduras en la piel,⁷ etc.

El FBP posee un carbono asimétrico en la parte α -arilpropiónica, por lo que es posible la existencia de los dos enantiómeros (S)- y (R)-. Se sabe que el enantiómero (S)- es el farmacológicamente activo, siendo unas 80 veces más potente que su homólogo (R)-.⁸

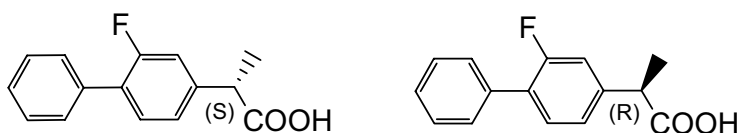


Figura 3.1. Estructura química del (S)- y (R)-FBP.

El efecto farmacológico del FBP está relacionado con la inhibición de la enzima ciclooxygenasa. El flurbiprofeno es un fármaco

no selectivo de COX, por lo que inhibe tanto la acción de COX-1 como de COX-2.

Con anterioridad, el (S)-FBP se utilizó como sonda para desplazar inhibidores fluorescentes del centro activo de COX. Las variaciones en la emisión de fluorescencia han proporcionado información relevante sobre las interacciones que existen entre estos inhibidores con COX-1 y con COX-2.⁹⁻¹¹ Por otra parte, existen estudios de fluorescencia en los que se ha estudiado la interacción que tiene lugar entre FBP y albúmina sérica humana.¹² Este hecho es importante ya que el conocimiento exhaustivo sobre la formación de complejos entre fármacos y proteínas es un proceso importante para la obtención de información detallada y para una mejor comprensión del transporte y biodistribución de fármacos en el organismo.

Como se comentó en el capítulo de *introducción*, la mayoría de los AINES derivados de los ácidos 2-arilpropiónicos son capaces de absorber luz solar y de producir daños en la piel: son fototóxicos, fotoalérgicos y fotocarcinogénicos. Se han descrito las propiedades fotofísicas de la mayoría de este tipo de fármacos, como por ejemplo del carprofeno, ketoprofeno, naproxeno, ácido tiaprofénico, etc.¹³ Estas son útiles para poder entender el origen del daño fotoinducido que producen estos fármacos en el organismo. Sin embargo, hasta el momento no se había caracterizado los estados excitados de menor energía del FBP. Así pues, no se había descrito el estado excitado singlete de menor energía del fármaco, ni su estado excitado triplete. El FBP no es un fármaco con propiedades fototóxicas y fotoalérgicas, ya que no es capaz de absorber luz solar para generar este tipo de daño.

El conocimiento de las propiedades de los estados excitados es interesante desde el punto de vista de su utilización como sonda para estudiar la formación de complejos con biomoléculas.

Una investigación detallada sobre las propiedades fotofísicas del FBP puede ser de gran ayuda para entender su fotorreactividad, que generalmente implica la rotura del enlace C-C situado en la posición α al grupo carbonilo, que conduce finalmente a productos derivados de la descarboxilación, y para obtener información sobre la variabilidad de éstas según el medio en el que se encuentren, lo cual puede servir de ayuda para estudiar la interacción del FBP con proteínas.

El objetivo de este capítulo es estudiar las propiedades fotofísicas y fotoquímicas del fármaco FBP. Se pretende caracterizar los estados excitados singlete y triplete de menor energía del fármaco, así como los fotoproductos que puede generar al ser irradiado con una fuente de luz, con el fin de entender en mayor medida su fotorreactividad.

3.2. Resultados y discusión

3.2.1. Estudios de fluorescencia

El flurbiprofeno presenta un máximo de absorción a 248 nm y un hombro a 272 nm. En la Figura 3.2 se muestra el espectro de absorción UV-Vis del (S)-FBP en disolución de tampón fosfato (PBS) 0.01 M, pH = 7.4.

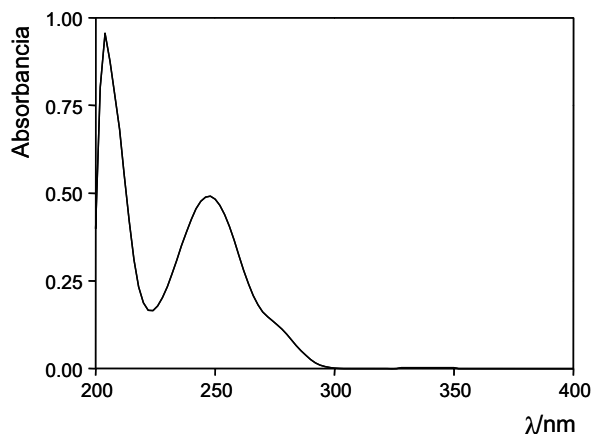


Figura 3.2. Espectro UV-Vis del (S)-FBP (2.5×10^{-5} M) en disolución PBS 0.01 M (pH = 7.4).

En el espectro de fluorescencia, excitando a 254 nm, el máximo de emisión se encuentra alrededor de 310 nm. En la Figura 3.3 se muestra el espectro de emisión y de excitación del (S)-FBP, donde en este último se fijó la emisión a 300 nm. La intersección entre las dos bandas, después de normalizar, permitió determinar la energía del primer estado excitado singlete del FBP, cuyo valor es de 99 kcal mol^{-1} .

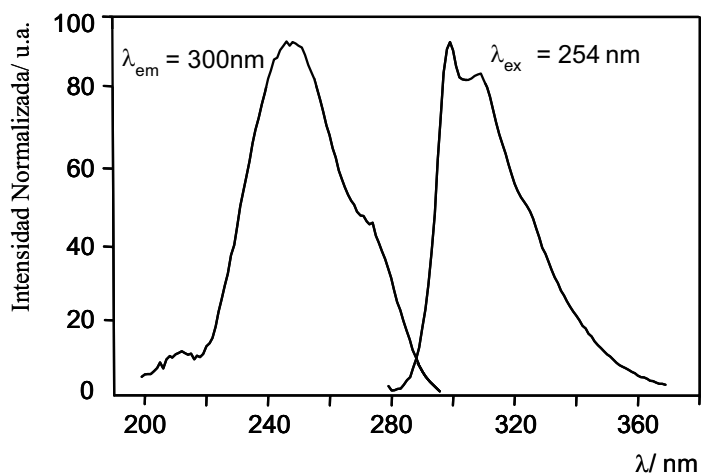


Figura 3.3. Espectros normalizados de excitación y emisión del (S)-FBP en PBS (0.01 M, pH = 7.4).

No se observaron cambios apreciables en los espectros de absorción y emisión cuando se hizo uso de disolventes de distinta polaridad, como metanol, hexano o acetonitrilo. Por otra parte, tampoco se observaron variaciones significativas en el espectro de emisión al pasar de una longitud de onda de excitación de 254 nm a otra de 281 nm. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (ϕ_F) se determinaron en los disolventes anteriores y para las dos longitudes de onda de excitación mencionadas. Además, se midieron los tiempos de vida del primer estado excitado singlete (τ_F) del (S)-FBP, y se determinaron las constantes de desactivación de fluorescencia (k_F). Estos valores se muestran en la Tabla 3.1.

La fluorescencia del (S)-FBP resultó ser sensible a la presencia de oxígeno. Por esta razón, al burbujear las muestras con O_2 , se observó una disminución en el rendimiento cuántico y en el tiempo de vida de fluorescencia del fármaco. Así pues, excitando a 281 nm en

disolución de acetonitrilo, los valores obtenidos fueron de $\phi_F = 0.15$ y $\tau_F = 1.0$ ns.

Disolvente	ϕ_F^a	τ_F/ns	k_F/s^{-1}
MeCN	0.20 (0.22)	1.7	1.2×10^8
MeOH	0.27 (0.27)	1.5	1.8×10^8
Hexano	0.32 (0.33)	2.0	1.6×10^8
PBS	0.15 (0.15)	0.7	2.1×10^8

Tabla 3.1. Propiedades fotofísicas derivadas del primer estado excitado singlete del (S)-FBP en disolución y en atmósfera de N_2 . ^a Medidas obtenidas excitando a 254 ó 281 nm (entre paréntesis).

La Tabla 3.2 muestra los valores de ϕ_F y τ_F en atmósfera de aire.

Disolvente	ϕ_F	τ_F/ns
MeCN	0.15	1.0
Hexano	0.26	1.8
PBS	0.12	0.6

Tabla 3.2. Propiedades fotofísicas derivadas del primer estado excitado singlete del (S)-FBP en disolución y en atmósfera de aire. Medidas obtenidas excitando a 266 nm.

3.2.2. Estudios de fotólisis de destello láser

La Figura 3.4 muestra el espectro de absorción de las especies transitorias generadas por el (S)-FBP al absorber luz, así como la cinética de desactivación monitorizada a 360 nm. Los experimentos se realizaron en disolución de (S)-FBP (2.5×10^{-5} M) en PBS 0.01 M tras excitación por láser pulsado a una longitud de onda de 266 nm. La banda obtenida se asignó a la absorción triplete-triplete del FBP, cuyo

máximo se encuentra a 360 nm. En el caso del bifenilo (cromóforo del FBP), se encuentra descrita la absorción triplete-triplete con máximo a $\lambda = 360$ nm y $\tau_T = 130$ μ s.¹⁸

En la Figura 3.5 se muestran los espectros de absorción de la especie transitoria generada por el (S)-FBP (2.5×10^{-5} M) en disolución de PBS monitorizando la señal en distintas condiciones: bajo atmósfera de N₂, aire y O₂. Como se puede apreciar, el oxígeno desactiva la especie transitoria generada, lo cual es característico de un estado transitorio de naturaleza triplete. En atmósfera de aire se desactiva considerablemente este estado, llegando incluso a desaparecer cuando la medida se registra en atmósfera de O₂.

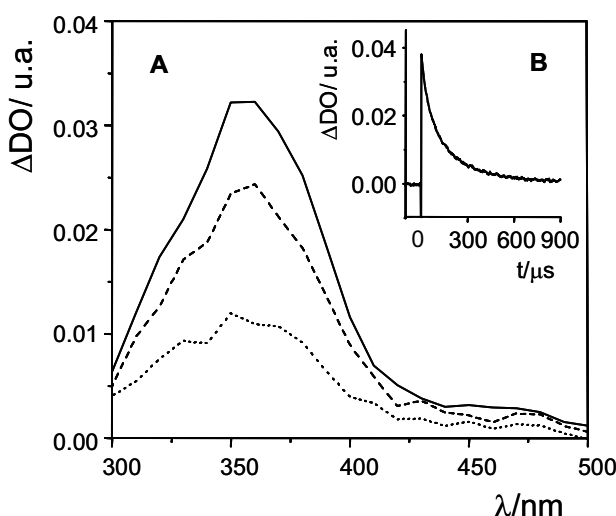


Figura 3.4. A) Espectro de fotólisis de destello láser del (S)-FBP en disolución PBS en atmósfera de N₂ (2.5×10^{-5} M) excitando a 266 nm. El espectro se ha registrado en las mismas condiciones a distintos tiempos: 14.4 μ s (———), 100 μ s (- - - -) y 310 μ s (.....) después del pulso del láser. **B)** Desactivación de la especie transitoria monitorizado a 360 nm en atmósfera de N₂.

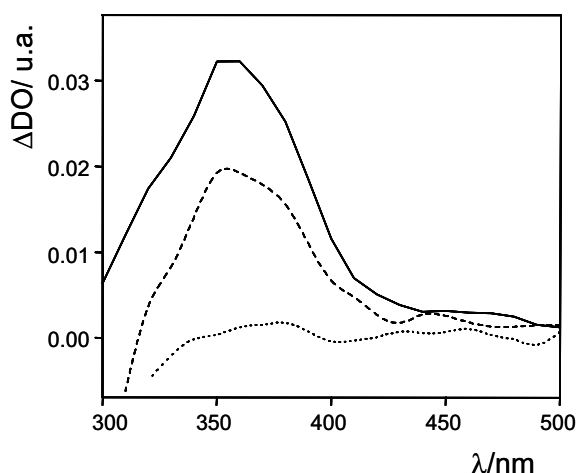


Figura 3.5. Espectro de FDL del (S)-FBP (2.5×10^{-5} M) en disolución de PBS excitando a 266 nm en atmósfera de N_2 (———), aire (- - - -) y O_2 (.....) 14.4 μs después del pulso del láser.

En la Tabla 3.3 se muestran las propiedades fotofísicas determinadas para el (S)-FBP en disolventes de distinta polaridad en atmósfera inerte. Se indican los rendimientos cuánticos de cruce intersistemas (ϕ_{CIS}), los tiempos de vida de triplete (τ_T), las constantes de cruce intersistemas (k_{CIS}) y las constantes de desactivación no radiante (k_{NR}).

Disolvente	ϕ_{CIS}	$\tau_T/\mu s$	k_{CIS}/s^{-1}	k_{NR}/s^{-1}
MeCN	0.71	31	4.2×10^8	4.1×10^7
MeOH	0.70	33	4.7×10^8	2.0×10^7
Hexano	0.65	15	3.3×10^8	1.0×10^7
PBS	0.45	106	6.4×10^8	5.0×10^8

Tabla 3.3. Propiedades fotofísicas derivadas del primer estado excitado triplete del (S)-FBP en disolución y en atmósfera de N_2 .

El tiempo de vida del estado excitado triplete varía entre 15 y 106 μs dependiendo del disolvente empleado, siendo el mayor valor el correspondiente al de disolución tamponada acuosa. La Tabla 3.3 también muestra el rendimiento cuántico de cruce intersistemas, el cual oscila entre 0.45 y 0.71; éste fue calculado por un método comparativo basado en la transferencia de energía por parte de otros sensibilizadores, como se indica de forma detallada en la parte experimental.

Como suele ser habitual, el comportamiento del estado excitado triplete resultó ser sensible a la presencia de O_2 . El valor de τ_T disminuyó considerablemente en atmósfera de aire, siendo de 0.61 μs en MeCN, 0.69 μs en hexano y 1.50 μs en PBS. Sin embargo, τ_T no fue dependiente de la potencia del láser (rango comprendido entre 4 y 20 mJ), por lo que se descartó la existencia de procesos de aniquilación triplete-triplete. Por otra parte, τ_T sí cambió al variar la concentración de FBP, ya que disminuyó al aumentar ésta; la constante de autodesactivación en acetonitrilo se muestra en la Tabla 3.4.

El espectro de absorción triplete-triplete del (S)-FBP también fue generado mediante fotosensibilización por benzofenona (BZP) o acetofenona (ACF), ya que la energía del estado excitado triplete de ambos es superior a la del estado excitado triplete del FBP, y absorben en una zona (superior a 300 nm) donde el FBP no lo hace. Así pues, al irradiar la BZP con el láser pulsado a 355 nm se obtuvo la señal típica del triplete de la BZP, con un máximo de absorción a 525 nm. En presencia de FBP, se observó una rápida desactivación de esta señal y la aparición de otra señal a 360 nm, correspondiente al triplete del FBP. Este proceso se muestra en la Figura 3.6, donde se aprecia la desaparición de la banda con máximo a 525 nm con la correspondiente formación de la banda a 360 nm. La constante obtenida para este

proceso de transferencia de energía fue de $6.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en acetonitrilo y a temperatura ambiente.

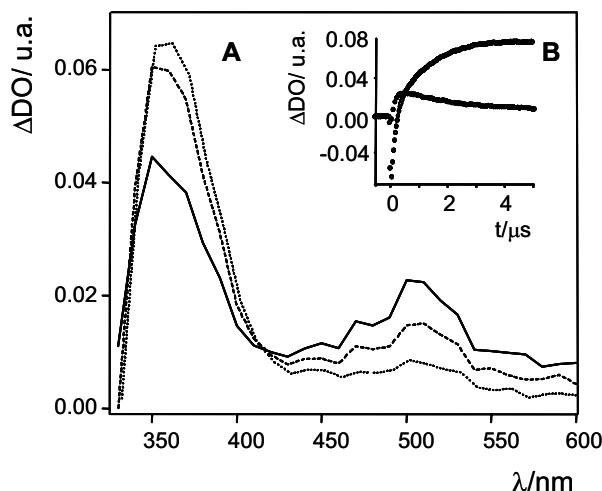


Figura 3.6. A) Espectros de las especies transitorias monitorizadas a distintos tiempos de 4 μs (—), 5.3 μs (- - -) y 8.5 μs (.....) después del pulso del láser, tras irradiar a 355 nm una muestra de BZP ($2 \times 10^{-3} \text{ M}$) en presencia de (S)-FBP ($5 \times 10^{-4} \text{ M}$) en atmósfera de N_2 , usando acetonitrilo como disolvente. **B)** Crecimiento y desactivación de las especies monitorizadas a 360 y 525 nm, respectivamente.

El coeficiente de absorción molar del triplete (ϵ_T) del FBP se calculó usando el de la BZP como referencia, asumiendo un valor de $6500 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 520 nm para este compuesto.¹⁴ En acetonitrilo, el valor obtenido para el (S)-FBP fue de $32000 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 360 nm, que no es muy distinto al del bifenilo ($\epsilon_T = 28000 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 360 nm).

Los rendimientos cuánticos de cruce intersistemas obtenidos para el (S)-FBP en los distintos disolventes se calcularon a partir del valor de ΔDO de la especie transitoria generada en disoluciones de BZP y (S)-FBP de igual absorbancia, del valor del coeficiente de absorción molar de sus tripletes en acetonitrilo (calculados anteriormente) y del valor conocido del rendimiento cuántico de cruce intersistemas de la

BZP, que es de prácticamente la unidad. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 3.3. A partir de los valores de ϕ_F , τ_F y ϕ_{CIS} , se pudieron calcular las constantes de los diversos procesos fotofísicos k_F , k_{CIS} y k_{NR} .

La energía del primer estado excitado triplete del (S)-FBP debe ser inferior a 69 kcal mol^{-1} , energía correspondiente al triplete de la BZP. Con el fin de acotar el rango de la energía de triplete del (S)-FBP para conocer de forma más precisa el valor de ésta, se utilizaron distintos agentes desactivantes de triplete, como 1,3-ciclohexadieno ($E_T = 52.4 \text{ kcal mol}^{-1}$), cloranilo ($E_T = 49.3 \text{ kcal mol}^{-1}$) y biacetilo ($E_T = 56.5 \text{ kcal mol}^{-1}$), estudiándose su interacción con el estado excitado triplete del (S)-FBP. La transferencia de energía triplete-triplete a todos estos aceptores está favorecida termodinámicamente. Las constantes de estos procesos se muestran en la Tabla 3.4. Los resultados indicaron que, como podía esperarse para un derivado de bifenilo, la energía del primer estado excitado triplete del FBP tenía un valor cercano a las 65 kcal mol^{-1} .

Sustrato	$k_D / \text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Autodesactivación	5.7×10^8
O ₂	8.2×10^8
1,3-Ciclohexadieno	1.0×10^{10}
Cloranilo	9.0×10^9
Biacetilo	5.0×10^9

Tabla 3.4. Reactividad en MeCN del estado excitado triplete del (S)-FBP con diversos agentes desactivantes.

3.2.3. Estudios fotoquímicos

La irradiación en estado estacionario del FBP en presencia de oxígeno y en diferentes disolventes da lugar a la formación de cuatro nuevos productos. En general, los rendimientos cuánticos de formación de fotoproductos son bajos (0.03 en PBS y menor de 0.005 en disolventes orgánicos).

Los resultados obtenidos en tres disolventes orgánicos están en concordancia con los previamente publicados sobre el comportamiento fotoquímico del FBP en metanol, que conduce a un proceso de descarboxilación.¹⁵ Sin embargo, en disolución acuosa se produjo la formación inesperada de un nuevo fotoproducto, el fenol **4**.¹⁶

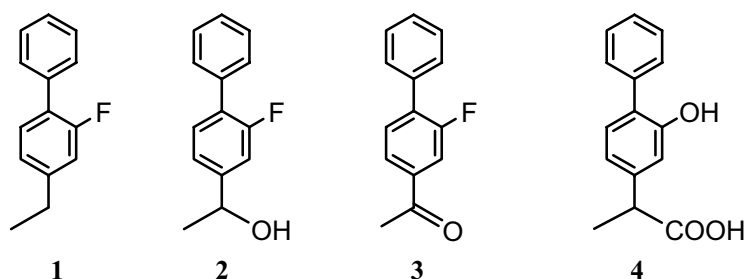


Figura 3.7. Fotoproductos generados por irradiación del FBP.

El fotoproducto **4** se genera por una fotosustitución nucleofílica aromática. La Figura 3.7 muestra los fotoproductos obtenidos por irradiación del FBP a 254 nm. En la Tabla 3.5 se indica el porcentaje de formación de estos fotoproductos en los distintos disolventes.

Disolvente	Conversión (%)	1	2	3	4
MeCN	71	-	3	97	-
MeOH	33	-	13	87	-
Hexano	65	-	25	75	-
PBS	100	50	-	23	27

Tabla 3.5. Fotoquímica del FBP ($\lambda_{ex} = 254 \text{ nm}$, N_2).

La Figura 3.8 muestra de forma esquemática el mecanismo por el cual se produce la formación de estos fotoproductos.

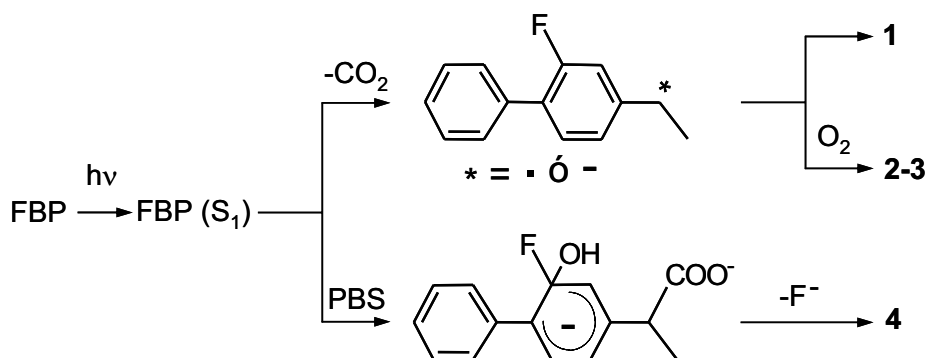


Figura 3.8. Mecanismo de la formación de los fotoproductos obtenidos tras irradiación del FBP.

Respecto a la obtención del fotoproducto 4, se han descrito procesos de fotosustitución nucleofílica aromática semejantes al del FBP con otras moléculas fluoroaromáticas, como es el caso de las fluoroquinolonas.^{17,18} En la Figura 3.8 se indica el mecanismo de reacción propuesto, según el cual el estado excitado implicado en la reactividad fotoquímica del FBP es el primer estado excitado singlete. En este sentido, las evidencias que apoyan este mecanismo son las siguientes: 1) en general, en las irradiaciones realizadas en disolución

acuosa en atmósfera de nitrógeno no se observó un aumento significativo en el proceso de fotodegradación de los productos irradiados, 2) la sensibilización *vía* triplete utilizando benzofenona no condujo a la formación significativa de fotoproductos, y 3) el rendimiento cuántico de fluorescencia, el tiempo de vida de fluorescencia y la eficiencia en el cruce intersistemas, fueron menores en medio acuoso; ello es indicativo de que ocurre un proceso alternativo de desactivación del primer estado excitado singlete, que da lugar a una mayor formación de fotoproductos derivados tanto de la fotosustitución nucleofílica aromática como de la fotodescarboxilación.

3.3. Conclusiones

Los primeros estados excitados singlete y triplete del (S)-FBP fueron caracterizados, identificándose, además, los principales procesos de desactivación que siguen. Asimismo, se determinaron los tiempos de vida del primer estado excitado singlete y triplete junto con los rendimientos cuánticos de los procesos fotofísicos implicados.

Por otra parte, los estudios de fotólisis en estado estacionario en medio acuoso proporcionaron evidencias sobre una importante ruta alternativa de desactivación fotoquímica, que condujo a un proceso de fotosustitución nucleofílica aromática, junto con el proceso de fotodescarboxilación que previamente había sido observado en disolventes orgánicos.

El comportamiento fotofísico del FBP se comparó con el del bifenilo (BP), cromóforo presente en el flurbiprofeno. Existen propiedades muy similares entre ambos; entre ellas se encuentran las energías de los primeros estados excitados singlete y triplete (99-100 y 65-70 kcal mol⁻¹, respectivamente), la posición del máximo de emisión de fluorescencia, situado alrededor de 300 nm, y del máximo de absorción triplete-triplete generado en FDL, a 360 nm.

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia y de cruce intersistemas del BP tienen un valor de 0.15 y 0.84 en disolvente polar, respectivamente.¹⁹ Esto concuerda con los obtenidos para el FBP, con valores cercanos a 0.2 y 0.7, respectivamente. Sin embargo, las diferencias más importantes observadas entre FBP y BP se dan en los tiempos de vida del primer estado excitado singlete y triplete; para la BP, estos tienen un valor de $\tau_F = 15$ ns y $\tau_T = 130$ μ s.¹⁹ Los valores obtenidos para el FBP fueron menores ($\tau_F = 1-2$ ns y $\tau_T = 15-106$ μ s), debido, probablemente, a la desactivación de los estados excitados por

formación de puentes de hidrógeno entre los grupos carboxílicos del FBP.

El comportamiento fotofísico y fotoquímico del FBP es comparable al comportamiento de otros AINES de la familia de los ácidos 2-arilpropiónicos. Así pues, el FBP comparte con el naproxeno (NPX) y el carprofeno (CPF) la posibilidad de generar estados excitados singlete y triplete detectables. Sin embargo, el ketoprofeno (KPF), el ácido tiaprofénico (ATP) y el suprofenos (SP) no muestran fluorescencia, debido a la eficacia en el proceso de cruce intersistemas, cuyo rendimiento cuántico es cercano a la unidad. Por otra parte, el FBP, al igual que el NPX y CPF, sufre el proceso de descarboxilación fotoinducida desde el estado excitado singlete con un bajo rendimiento cuántico (< 0.01), mientras que en el caso del KPF, ATP y SP, la descarboxilación ocurre desde el estado excitado triplete con una mayor eficacia ($\Phi_{\text{Descarboxilación}} > 0.4$). Finalmente, el FBP, al igual que el CPF, sufre el proceso de deshalogenación fotoinducida.

Con los resultados obtenidos y la comparativa efectuada con otros AINES, se puede concluir, de forma general, que los estados excitados singlete y triplete del FBP se pueden usar como sonda para el desarrollo de estudios relacionados con la naturaleza de las interacciones existentes entre FBP y proteínas. Especialmente, cabe resaltar que el estado excitado triplete es altamente sensible al medio en el que se encuentra, lo cual permite su uso como sonda para el desarrollo de este tipo de estudios.

3.4. Parte experimental

3.4.1. Materiales y disolventes

(S)-Flurbiprofeno, benzofenona, acetofenona, cloranilo, biacetilo y 1,3-ciclohexadieno fueron adquiridos de Aldrich.

Los disolventes orgánicos empleados (acetonitrilo, metanol y hexano) son de grado espectroscópico, adquiridos de Scharlau. Las disoluciones de PBS 0.01 M (pH = 7.4) empleadas se obtuvieron por disolución de pastillas tampón fosfato adquiridas de Sigma disueltas en agua desionizada Milli-Q.

3.4.2. Medidas de fluorescencia

La fluorescencia de las disoluciones en atmósfera de N₂ o de O₂ se efectuó burbujando las muestras durante 15 minutos antes de la realización del experimento. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia se determinaron usando β-metilestireno como referencia ($\phi_F = 0.35$ a 281 nm y 0.30 a 254 nm en hexano).²⁰ La absorbancia de las muestras a la longitud de onda de excitación se mantuvo en un valor inferior a 0.1. El cálculo de ϕ_F (Tablas 3.1 y 3.2) se realizó haciendo uso de la ecuación 3.1:

$$\phi_F = \phi_{F(\text{referencia})} \frac{A}{A_{\text{referencia}}} \frac{Abs_{\text{referencia}}}{Abs} \frac{n^2}{n_{\text{referencia}}^2} \quad (3.1)$$

donde $\phi_{F(\text{referencia})}$ es el rendimiento cuántico de fluorescencia del β-metilestireno, A es el área bajo la curva de fluorescencia del FBP,

$A_{referencia}$ es el área bajo la curva de fluorescencia del β -metilestireno, $Abs_{referencia}$ es la absorbancia del β -metilestireno a la longitud de onda de excitación, Abs es la absorbancia del FBP a la longitud de onda de excitación y $n_{referencia}$ y n son, respectivamente, los índices de refracción de los disolventes empleados.

Los valores de k_F (Tabla 3.1) se obtuvieron haciendo uso de la ecuación 3.2:

$$k_F = \frac{\phi_F}{\tau_F} \quad (3.2)$$

donde ϕ_F es el rendimiento cuántico de fluorescencia del FBP en el disolvente utilizado, y τ_F es el tiempo de vida de fluorescencia del FBP.

3.4.3. Medidas de fotólisis de destello láser

Los experimentos de fotólisis de destello láser se realizaron a 266 y 355 nm. Para las medidas realizadas en atmósfera de N_2 o de O_2 , se purgaron las muestras durante 30 minutos antes de la realización del experimento. La absorbancia de las muestras se mantuvo a 0.2 a la longitud de onda de excitación.

La determinación de los rendimientos cuánticos de cruce intersistemas (ϕ_{CIS}) del FBP en los distintos disolventes (Tabla 3.3), se realizó por sensibilización del triplete del FBP con benzofenona (BZP) a la longitud de onda de excitación del láser de 355 nm. Para ello se debe conocer el coeficiente de absorción molar de triplete (ϵ_T) del sensibilizador y del FBP, así como el rendimiento cuántico de formación de triplete del sensibilizador usado como referencia (ϕ_T).

Para el cálculo del coeficiente de absorción molar del FBP (ε_T^{FBP}) se debe establecer la condición de una eficiencia de desactivación del triplete de la BZP por el FBP mayor del 95%. Una vez se han establecido estas condiciones, se puede calcular ε_T^{FBP} según la ecuación 3.3:

$$\varepsilon_T^{FBP} = \frac{\varepsilon_T^{BZP} \cdot \Delta DO^{FBP}}{\Delta DO^{BZP}} \quad (3.3)$$

donde ε_T^{BZP} es el coeficiente de absorción molar de triplete de la BZP ($\varepsilon_T^{BZP} = 6500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 520 nm), ΔDO^{BZP} es la absorbancia del triplete de la BZP generado a $\lambda_{ex} = 355 \text{ nm}$, con máximo a 520 nm, y ΔDO^{FBP} es la absorbancia del triplete del FBP generado por sensibilización con BZP a $\lambda_{ex} = 355 \text{ nm}$, con máximo a 360 nm.

Conocido el valor de ε_T^{FBP} , se puede calcular el rendimiento cuántico de cruce intersistemas del FBP (ϕ_{CIS}^{FBP} , $\lambda_{ex} = 266 \text{ nm}$) conociendo ΔDO de FBP y de BZP en las mismas condiciones que las establecidas para el cálculo de ε_T^{FBP} y el valor del rendimiento cuántico de la benzofenona ($\phi_T^{BZP} = 1$), según la ecuación 3.4:

$$\phi_{CIS}^{FBP} = \phi_T^{BZP} \frac{\Delta DO^{FBP}}{\Delta DO^{BZP}} \frac{\varepsilon_T^{BZP}}{\varepsilon_T^{FBP}} \quad (3.4)$$

Para el cálculo del valor de la constante de cruce intersistemas del FBP (k_{CIS}^{FBP} , Tabla 3.3) en los distintos disolventes, se hizo uso de la ecuación 3.5:

$$k_{CIS}^{FBP} = \frac{\phi_{CIS}^{FBP}}{\tau_F} \quad (3.5)$$

donde ϕ_{CIS}^{FBP} es el rendimiento cuántico de cruce intersistemas del FBP y τ_F es el tiempo de vida de fluorescencia del FBP en los distintos disolventes.

El cálculo de la constante de desactivación no radiante (k_{NR} , Tabla 3.3) se realizó mediante el uso de la ecuación 3.6:

$$k_{NR} = \frac{\phi_{NR}}{\tau_F} \quad (3.6)$$

donde ϕ_{NR} es el rendimiento cuántico de desactivación no radiante del FBP ($\phi_{NR} = 1 - \phi_F^{FBP} - \phi_{CIS}^{FBP} - \phi_{Fotoproductos}$) y τ_F es el tiempo de vida de fluorescencia del FBP en los distintos disolventes.

Los valores de las constantes de desactivación k_D (Tabla 3.4) se calcularon haciendo uso de la ecuación de Stern-Volmer²¹ (ecuación 3.7):

$$\frac{I}{\tau_T} = k_0 + k_D \cdot [D] \quad (3.7)$$

donde τ_T es el tiempo de vida de triplete del FBP, k_0 es la inversa del tiempo de vida de triplete del FBP en ausencia de desactivador, k_D es la

constante de desactivación de triplete del FBP por interacción con el agente desactivante (que puede ser O₂, cloranilo, biacetilo, etc) y [D] es la concentración de agente desactivante. Por tanto, de la pendiente de la recta obtenida tras representar 1/τ_T vs [D], se puede obtener el valor de k_D. Como ejemplo, se muestra la gráfica obtenida para la obtención de la constante de autodesactivación del FBP.

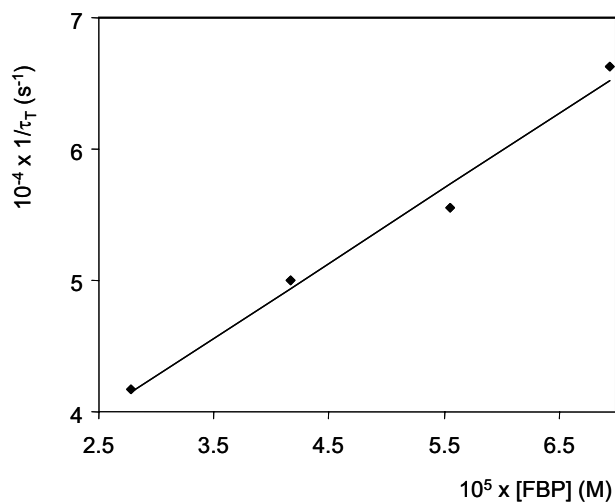


Figura 3.9. Representación Stern-Volmer para calcular el valor de la constante de autodesactivación del flurbiprofeno.

De la pendiente de la recta, con un valor del coeficiente de regresión $R^2 = 0.997$, se obtuvo el valor de $k_D = 5.7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

3.4.4. Fotólisis en estado estacionario

Las disoluciones de FBP (5 mM) en los distintos disolventes (metanol, hexano, acetonitrilo y PBS) fueron irradiadas en tubos de cuarzo en un fotorreactor Luzchem. La longitud de onda de excitación escogida fue de 254 nm, donde las muestras se irradiaron durante 16 h.

La reacción fue seguida por RMN-¹H y por cromatografía de gases acoplada a detector de masas. Los rendimientos cuánticos de fotorreacción se determinaron haciendo uso del ácido fenilgloxílico como actinómetro.

De los productos de irradiación obtenidos, el fotoproducto **4** se caracterizó haciendo uso de diferentes técnicas: difracción de rayos X (Figura 3.10, referencia CCDC 662956), cromatografía de gases con espectrómetro de masas acoplado, resonancia magnética nuclear de protón y de carbono (Figuras 3.11 y 3.12, respectivamente).

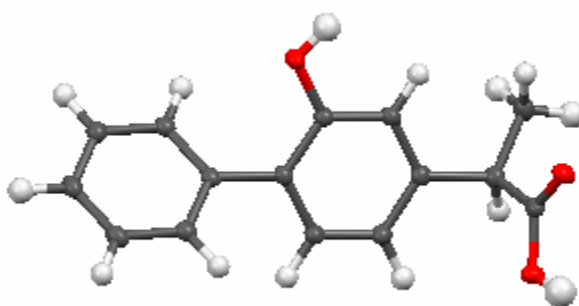


Figura 3.10. Estructura de rayos X del fotoproducto **4**.

Ácido 2-(2-hidroxi-1,1'-bifenil-4-il) propanoico (4**).**

Masa molecular: Mr = 242.

Purificación: cromatografía preparativa (DCM).

Temperatura de fusión: 110-112 °C.

Espectro de RMN-¹H (CDCl₃), δ (ppm): 7.45-6.93 (m, 8H), 3.73 (q, 1H, J = 7.2 Hz), 1.52 (d, 3H, J = 7.2 Hz).

Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃), δ (ppm): 180.6, 152.9, 141.2, 137.1, 130.8, 129.5, 129.4, 128.1, 127.6, 120.4, 115.4, 45.4, 18.3.

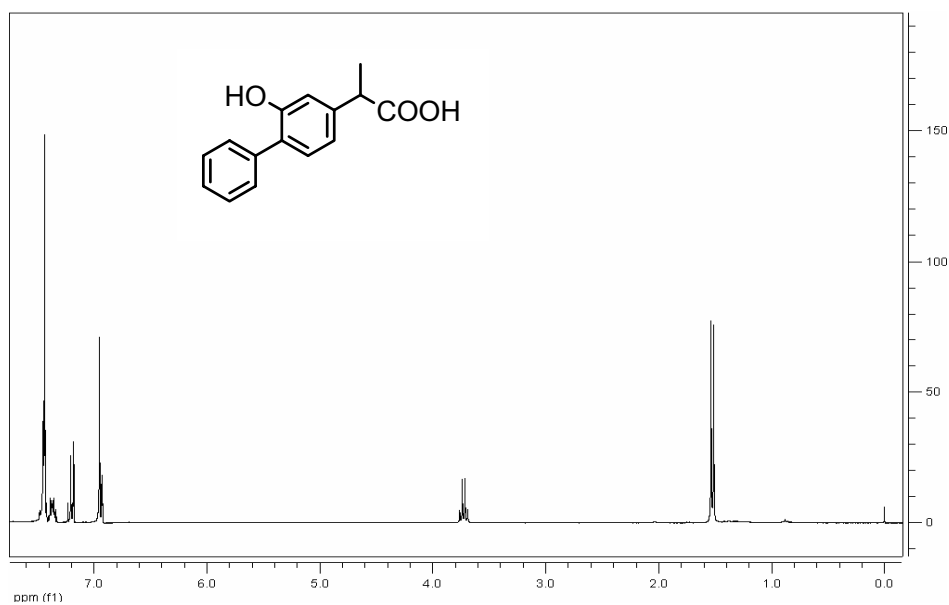


Figura 3.11. RMN-¹H del fotoproducto 4.

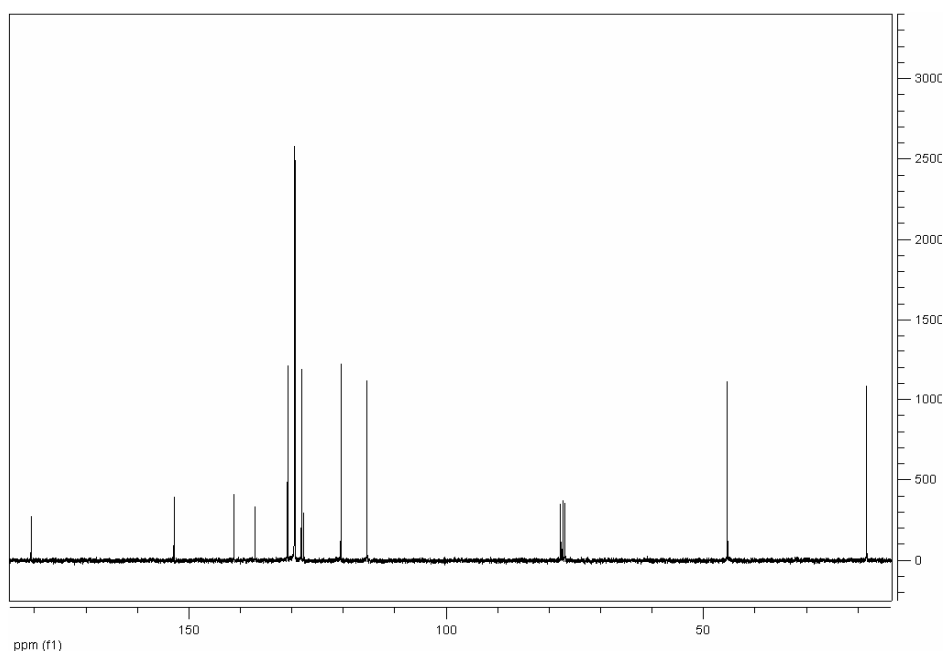


Figura 3.12. RMN-¹³C del fotoproducto 4.

3.5. Referencias bibliográficas

1. Nishisawa, E. E., Wynalda, D. J., Suydam, D. E., Molony, B. A. *Thrombosis research*. **1973**; 3: 577-88.
2. Kaiser, D. G., Brooks, C. D., Lomen, P. L. *Am. J. Med.* **1986**; 80: 10-5.
3. Rovensky, J., Micekova, D. *Drug. Exp. Clin. Res.* **2000**; 26: 19-24.
4. Bellamy, N., Bensen, W. G., Ford, P. M., Huang, S. H., Lang, J. Y. *Clin. Invest. Med.* **1992**; 15: 427-434.
5. Muckle, D. S. *Am. J. Med.* **1986**; 80: 76-80.
6. Solomon, G. D., Kunkel, R. S. *Clev. Clin. J. Med.* **1993**; 60: 43-48.
7. Tan, P., Flowers, F. P., Araujo, O. E., Doering, P. *Drug Intel. Clin. Pharm.* **1986**; 20: 496-499.
8. Greig, M. E., Griffin, R. L. *J. Med. Chem.* **1975**; 18: 112-116.
9. Lanzo, C. A., Beechem, J. M., Talley, J., Marnett, L. J. *Biochemistry*. **1998**; 37: 217-226.
10. Timofeevski, S. L., Prusakiewskiewicz, J. J., Rouzer, C. A., Marnett, L. J. *Biochemistry*. **2002**; 41: 9654.
11. Lanzo, C. A., Sutin, J., Rowlinson, S., Talley, J., Marnett, L. J. *Biochemistry*. **2000**; 39: 6228.
12. Rahman, M. H., Yamasaki, K., Shin, Y.-H., Lin, C. C., Otagiri, M. *Biol. Pharm. Bull.* **1993**; 16: 1169-1174.
13. Boscá, F., Marín, M. L. and Miranda, M. A. *Photochem. Photobiol.* **2001**; 74: 637-655.
14. Wintgens, V., Johnston, L. J., Scaiano, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**; 110: 511-517.
15. Castell, J. V., Gómez-Lechón, M. J., Miranda, M. A., Morera, I. M. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1992**; 13: 71-81.
16. Adams, S. S., Armitage, B. J., Nicholson, J. S. *Ger. Offen. Patent* written in German. **1974**; 54 pp.

17. Fasani, E., Negra, F. F., Barberis, M. M., Monti, S., Albini, A. *J. Org. Chem.* **1999**; *64*: 5388-5395.
18. Albini, A., Monti, S. *Chem. Soc. Rev.* **2003**; *32*: 238-250.
19. Murov, S. L., Carmichael, I., Hugh, G. L. *Handbook of Photochemistry*, Marcel Dekker, Inc., New York, 2nd edn. **1993**.
20. Lewis, F. D., Bassani, D. M., Caldwell, R. A., Unett, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**; *116*: 10477.
21. Wayne, C. E., Wayne, R. P. In *Photochemistry*; Compton, R. G. Ed.; Oxford Chemistry Press, **1996**.

CAPÍTULO 4. *Sistemas intramoleculares flurbiprofeno-
aminoácido*

4.1. Introducción

Una vez estudiadas las propiedades de los estados excitados del fármaco, que se usarán como parámetros sensibles al medio, y siguiendo la metodología expuesta en el capítulo de *objetivos*, se realizó, en primer lugar, un estudio sobre las interacciones que tienen lugar entre el FBP y los aminoácidos más relevantes del centro activo de las proteínas cuando ambos se encuentran unidos covalentemente. Para ello se sintetizaron una serie de diadas entre el FBP y el *triptófano* (Trp), aminoácido presente en el sitio I de unión de las albúminas séricas,¹⁻¹² y entre el FBP y la *tirosina* (Tyr), aminoácido presente en el sitio II de unión de las albúminas séricas y en el centro activo de COX.

Se llevaron a cabo estudios de fluorescencia y de fotólisis de destello láser de los sistemas covalentes descritos con el fin de intentar trasladar la información obtenida a las interacciones existentes en sistemas fármaco/proteína. El uso de estas técnicas presenta las siguientes ventajas:

✓ *Fluorescencia*: ha sido una técnica muy utilizada para estudiar el tipo de interacciones que tienen lugar entre fármacos y proteínas,¹³ basándose en el hecho de que la fluorescencia del Trp es altamente sensible al medio que le rodea. Además, el indol (cromóforo del Trp) en su estado excitado puede actuar como dador de electrones.¹⁴

✓ *Fotólisis de destello láser*: el estado excitado triplete del FBP ha sido caracterizado. El tiempo de vida de triplete es sensible al medio en el que se encuentra,¹⁵ como se ha descrito en el capítulo anterior.

Se realizó un estudio comparativo sobre el comportamiento de las distintas diadas diastereoméricas sintetizadas a partir del (S)-aminoácido y del flurbiprofeno en sus dos formas enantioméricas puras, (S)- o (R)-, en las que fármaco y aminoácido se encuentran covalentemente unidos mediante un enlace tipo amida o tipo éster.

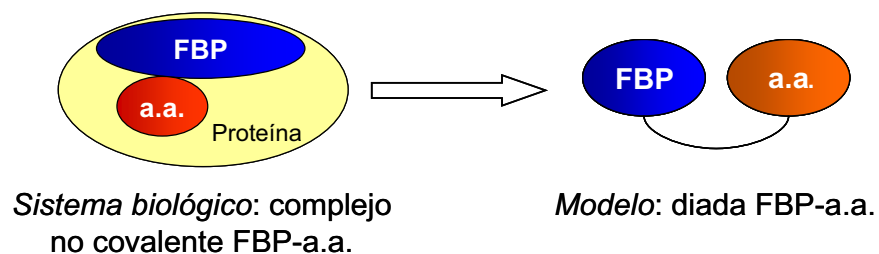


Figura 4.1. Interacción FBP-a.a. en el sistema biológico y en el modelo.

4.2. Resultados y discusión

4.2.1. Estudios fotofísicos de las diadas FBP-Trp en acetonitrilo

En primer lugar se sintetizaron una serie de diadas conteniendo flurbiprofeno y triptófano. En un caso el triptófano tiene metilado el grupo carboxílico (TrpMe), y en otro caso el grupo carboxílico está reducido a la forma alcohol, dando lugar al triptofanol (TrpOH). La Figura 4.2 muestra la estructura química de las diadas sintetizadas y de los modelos (S)- o (R)-FBP, (S)-TrpMe y (S)-TrpOH. Debido a su baja solubilidad en agua, los experimentos se llevaron a cabo en acetonitrilo.

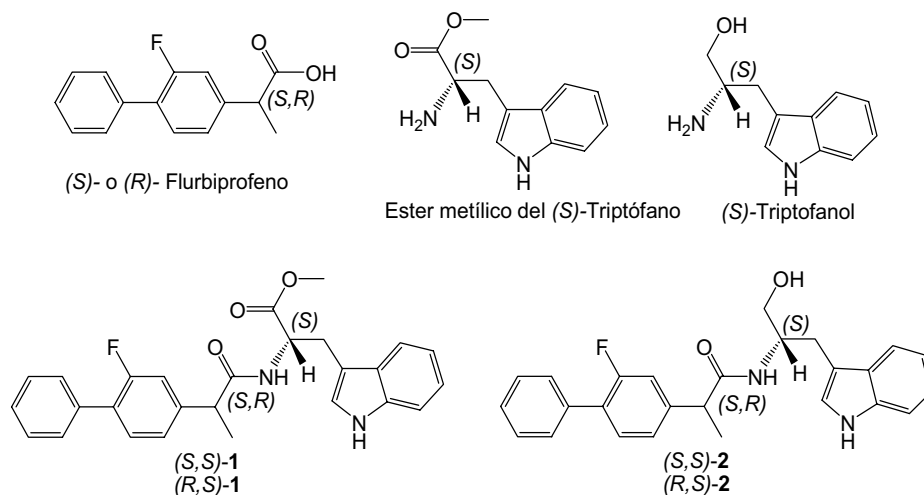


Figura 4.2. Estructura química del flurbiprofeno, éster metílico del (S)-triptófano y (S)-triptofanol, y de las diadas entre FBP y (S)-TrpMe o (S)-TrpOH.

Las diadas (*S,S*)-1 y (*R,S*)-1 son dos amidas diastereoméricas en las que el (*S*) o (*R*)-FBP está unido con el éster metílico del (*S*)-Trp. El espectro de absorción UV-vis se muestra en la Figura 4.3, y como se puede observar, resultó ser idéntico al que correspondería de la suma de los espectros del (*S*)-FBP y del (*S*)-TrpMe aislados a la misma concentración. Este hecho es indicativo de la ausencia de una interacción significativa entre los dos cromóforos en el estado fundamental.

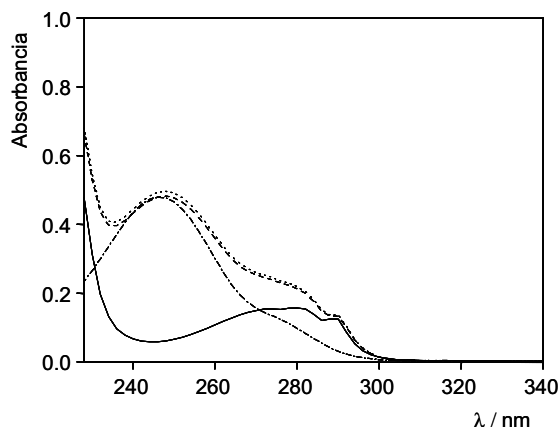


Figura 4.3. Espectro UV-vis del (*S*)-FBP (---), (*S*)-TrpMe (—), (*S,S*)-1 (---) y (*R,S*)-1 (.....) en acetonitrilo a concentración 2.5×10^{-5} M.

Los espectros de fluorescencia en estado estacionario de los modelos ((*S*)-FBP y (*S*)-TrpMe) y de las diadas (*S,S*)-1 y (*R,S*)-1 se obtuvieron tras excitar la muestra a $\lambda_{ex} = 266$ nm (Figura 4.4). Como puede apreciarse por los espectros UV-vis, a esta longitud de onda, cerca del 60% de la luz es absorbida por el bifenilo (cromóforo del FBP), mientras que el 40% restante es absorbido por el indol (cromóforo del Trp).

Los espectros de fluorescencia se registraron utilizando disoluciones con la misma absorbancia a la longitud de onda de

excitación ($A_{266} = 0.08$). El fenómeno observado más importante fue que en ambas diadas se produjo una desactivación casi total de la fluorescencia, que consistió en una banda de baja intensidad atribuida al $^1\text{Trp}^*$, cuyo máximo se sitúa a 340 nm.¹⁴ Así pues, no se observó emisión por parte del FBP ($\lambda_{\text{máx}} = 310$ nm).¹⁵ Además, al normalizar los espectros, se detectó la aparición de una nueva banda entre 380 y 500 nm, especialmente para la diada (R,S)-1. Esta nueva banda podría corresponder a la formación de un exciplexo (Figura 4.4.B).

Los tiempos de vida de fluorescencia medidos a $\lambda_{\text{em}} = 340$ nm fueron mucho menores en las diadas (0.9 ns para ambas) que en el modelo (S)-TrpMe (6.4 ns), lo cual es indicativo de la existencia de una desactivación dinámica. Por el contrario, los tiempos de vida de fluorescencia registrados a $\lambda_{\text{em}} = 440$ nm (máximo de emisión del posible exciplexo) fueron mayores (7.6 y 5.1 ns para (S,S)-1 y (R,S)-1, respectivamente).

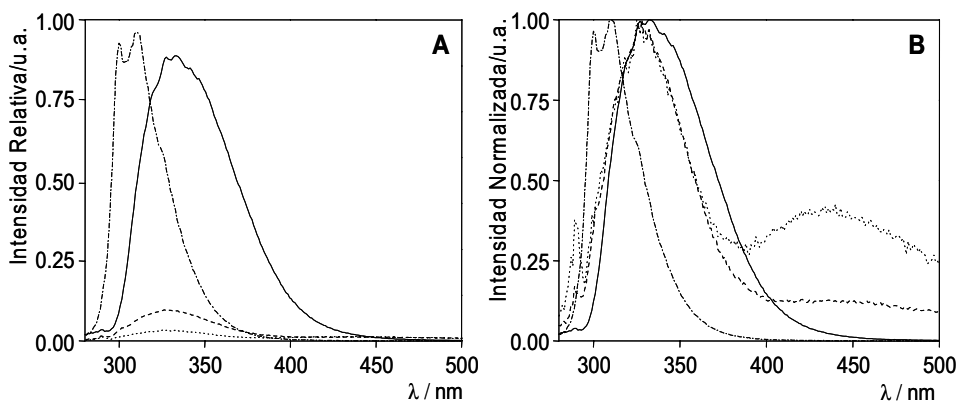


Figura 4.4. A) Espectros de fluorescencia y **B)** Espectros normalizados de fluorescencia, todos ellos registrados en acetonitrilo/ N_2 a concentración 1.0×10^{-5} M y $\lambda_{\text{ex}} = 266$ nm, del (S)-FBP (- · - ·), (S)-TrpMe (—), (S,S)-1 (- - -) y (R,S)-1 (.....).

Por otra parte, cuando se realizaron los ensayos de FDL a la longitud de onda de excitación de 266 nm para las diadas (S,S)-1 y (R,S)-1, se observó la típica banda de absorción triplete-triplete del FBP (máximo de absorción a 360 nm).¹⁵ El tiempo de vida de triplete en ambas diadas fue el mismo que para el FBP aislado (ca. 24 μ s), lo que indica la ausencia de una interacción intramolecular en el estado excitado triplete. En la Figura 4.5 se muestra el espectro de la especie transitoria y la cinética de desactivación de la señal a 360 nm.

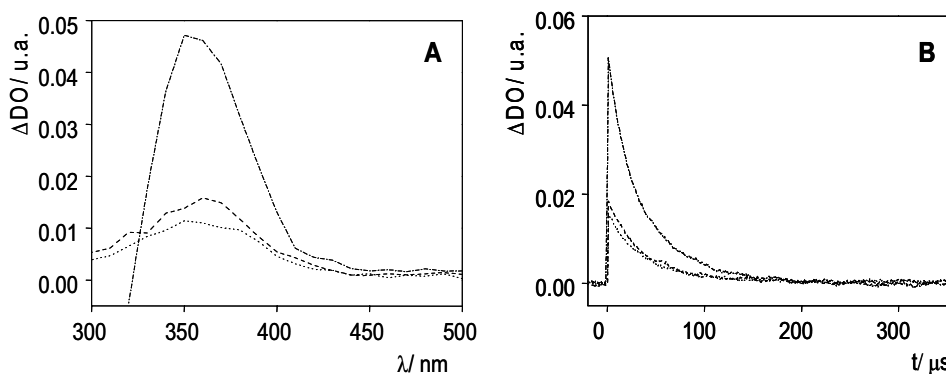


Figura 4.5. A) Espectros de FDL obtenidos 6 μ s después del pulso del láser del (S)-FBP (- - -), (S,S)-1 (- · - ·) y (R,S)-1 (······) registrados en acetonitrilo/ N_2 a concentración 2.5×10^{-5} M y $\lambda_{ex} = 266$ nm. **B)** Desactivaciones monitorizadas a 360 nm.

Como los tiempos de fluorescencia medidos para las diadas (S,S)-1 y (R,S)-1 fueron cortos (cerca del límite de detección del instrumento), con la finalidad de minimizar posibles errores de las medidas realizadas, se sintetizaron dos nuevas diadas diastereoméricas conteniendo FBP (nuevamente en sus dos formas enantioméricas puras) y un derivado del triptófano, el (S)-triptofanol ((S)-TrpOH), que posee un tiempo de vida de singlete mayor (8.1 ns) que el (S)-TrpMe (6.4 ns). Las nuevas diadas sintetizadas fueron (S,S)-2 y (R,S)-2, cuyas estructuras químicas se muestran en la Figura 4.2.

El espectro UV-vis de estos sistemas resultó ser muy similar al de los sistemas FBP-TrpMe. En este caso tampoco se observó una interacción intramolecular relevante entre los cromóforos bifenilo e indol en el estado fundamental.

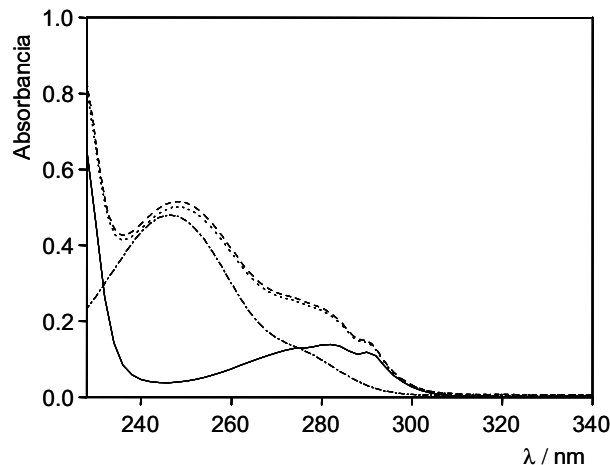


Figura 4.6. Espectro UV-vis del (S)-FBP (---), (S)-TrpOH (—), (S,S)-2 (---) y (R,S)-2 (.....) en acetonitrilo a concentración 2.5×10^{-5} M.

La fluorescencia en estado estacionario de los modelos ((S)-FBP y (S)-TrpOH) y de las diadas (S,S)-2 y (R,S)-2 ($A_{266} = 0.08$, MeCN, N_2) se registró a $\lambda_{ex} = 266$ nm (Figura 4.7).

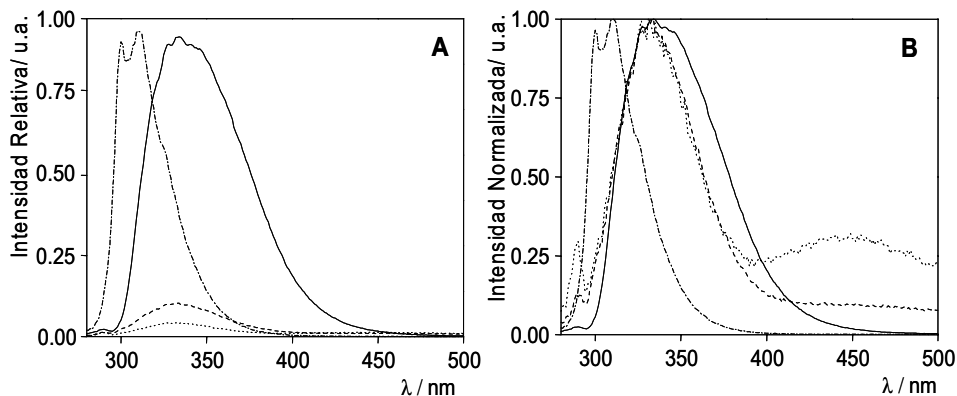


Figura 4.7. A) Espectros de fluorescencia y B) Espectros normalizados de fluorescencia, todos ellos registrados en acetonitrilo/ N_2 a concentración 1.0×10^{-5} M y $\lambda_{\text{ex}} = 266$ nm, del (S)-FBP (· · · ·), (S)-TrpOH (—), (S,S)-2 (---) y (R,S)-2 (· · · · · ·).

De nuevo se observó una fuerte desactivación en la fluorescencia de ambas diadas; la emisión observada se atribuyó al (S)-TrpOH. Además, los tiempos de vida de fluorescencia fueron más cortos en las diadas (ca. 1.1 ns en ambos casos) que en el modelo (S)-TrpOH (8.1 ns), lo que indica una desactivación dinámica intramolecular. Tras producirse la normalización de los espectros de fluorescencia de las diadas (S,S)-2 y (R,S)-2, nuevamente se observó la aparición de una banda entre 380 y 500 nm correspondiente al posible exciplexo formado (Figura 4.7.B). Se volvió a observar estereodiferenciación en el tiempo de vida de ambos exciplexos, medidos a $\lambda_{\text{em}} = 440$ nm, con unos valores de 6.7 ns para el isómero (S,S)-, y de 5.0 ns para el isómero (R,S)-, respectivamente.

En cuanto a las medidas de FDL de (S,S)-2 y (R,S)-2, la única señal que se observó tras excitación a 266 nm correspondió a la absorción triplete-triplete del FBP (Figura 4.8). Los tiempos de vida de triplete fueron iguales en las diadas y en el (S)-FBP aislado (ca. 24 μ s), lo cual indica la ausencia de interacción intramolecular desde el estado excitado triplete.

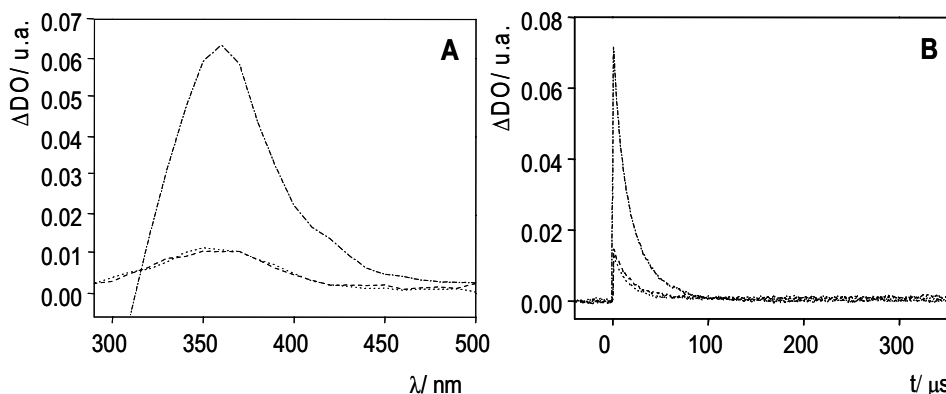
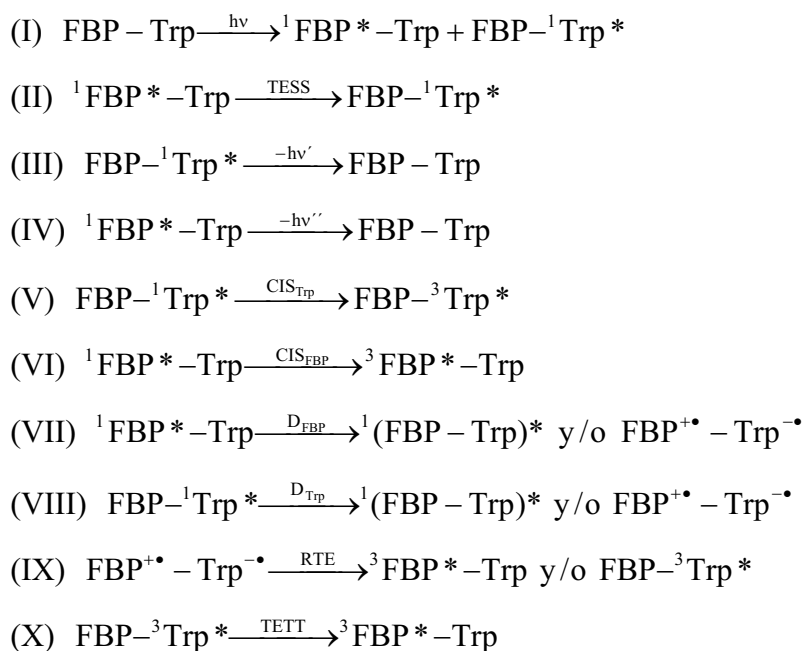


Figura 4.8. A) Espectros de FDL obtenidos 6 μ s después del pulso del láser del (S)-FBP (· · · · ·), (S,S)-2 (---) y (R,S)-2 (·····) registrados en acetonitrilo/ N_2 a concentración 2.5×10^{-5} M y $\lambda_{\text{ex}} = 266$ nm. **B)** Desactivaciones monitorizadas a 360 nm.

Los procesos de desactivación más importantes que pueden ocurrir tras excitación de las diadas FBP-Trp (donde el Trp se encuentra como TrpMe o TrpOH) se indican en el Esquema 4.1.



Esquema 4.1. Principales vías de desactivación de las diadas FBP-Trp.

Como se observa en el esquema, tras irradiación a 266 nm (I) se alcanza el primer estado excitado singlete, bien del FBP o del Trp, ya que ambas especies absorben luz a esa longitud de onda, según sus espectros UV-vis (ver Figuras 4.3 y 4.6). A continuación puede producirse una transferencia de energía singlete-singlete (TESS) desde ${}^1\text{FBP}^*$ ($E_s = 99 \text{ kcal mol}^{-1}$)¹⁵ al Trp ($E_s = 94 \text{ kcal mol}^{-1}$),¹⁶ la cual está termodinámicamente favorecida (II). La desactivación radiante desde ${}^1\text{Trp}^*$ o ${}^1\text{FBP}^*$ está representada en (III) y (IV), respectivamente. Los procesos (V) y (VI) corresponden al cruce intersistemas (CIS) desde el singlete del FBP o del Trp a su estado triplete. La desactivación intramolecular (D) desde el primer estado excitado singlete del FBP o del Trp para dar lugar a la formación de exciplejos o a un par de iones radicales, queda reflejado en (VII) y (VIII). La ruta (IX) muestra la

retrotransferencia electrónica (RTE) desde el par de iones radicales al FBP o al Trp, pudiéndose alcanzar así el primer estado excitado triplete de éstos. Finalmente, la transferencia de energía triplete-triplete (TETT) desde el Trp ($E_T = 71 \text{ kcal mol}^{-1}$)¹⁶ al FBP ($E_T = 65 \text{ kcal mol}^{-1}$),¹⁵ que es termodinámicamente posible, queda indicada en la ruta (X).

La Figura 4.9 muestra la energía relativa de los diferentes estados excitados de las diadas FBP-Trp junto con los principales procesos de desactivación que pueden seguir.

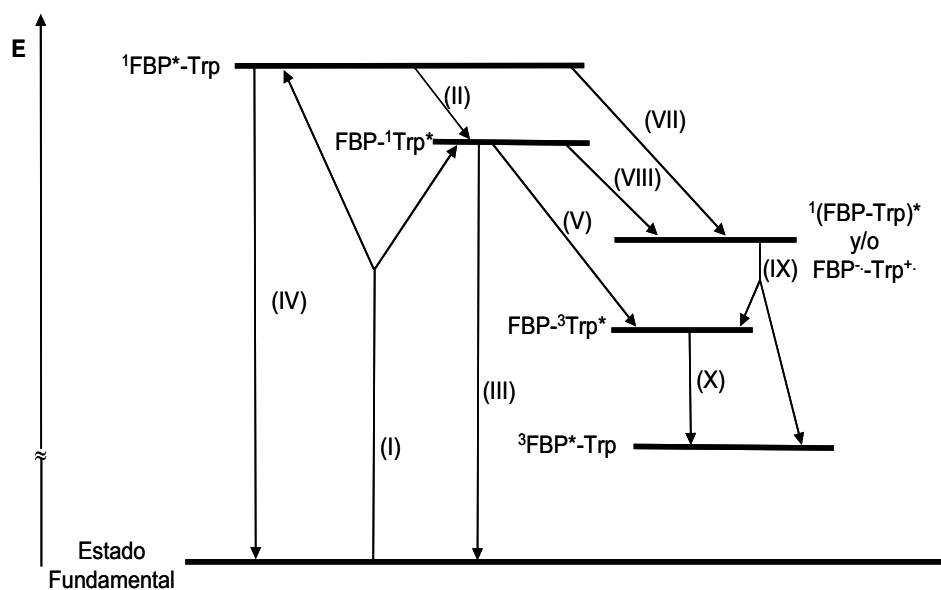


Figura 4.9. Diagrama de energía cualitativo de los diferentes estados excitados e intermedios reactivos generados tras excitación de las diadas FBP-Trp.

Se calcularon las constantes y los rendimientos cuánticos de desactivación de los procesos anteriormente descritos. Para la determinación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia (ϕ_F) se escogió como estándar el aminoácido libre Trp ($\phi_F = 0.13$ en agua).¹⁶ El valor de ϕ_F se calculó haciendo uso de la ecuación 4.1:

$$\phi_F = \phi_{F(\text{referencia})} \frac{A}{A_{\text{referencia}}} \frac{Abs_{\text{referencia}}}{Abs} \frac{n^2}{n_{\text{referencia}}^2} \quad (4.1)$$

donde $\phi_{F(\text{referencia})}$ es el rendimiento cuántico de fluorescencia del Trp, A es el área bajo la curva de fluorescencia del FBP, $A_{\text{referencia}}$ es el área bajo la curva de fluorescencia del Trp, $Abs_{\text{referencia}}$ es la absorbancia del Trp a la longitud de onda de excitación, Abs es la absorbancia del FBP a la longitud de onda de excitación y $n_{\text{referencia}}$ y n son los índices de refracción de los disolventes empleados.

Todos los valores de rendimientos cuánticos y constantes de desactivación se muestran en la Tabla 4.1.

Compuesto	ϕ_F	τ_F^a (ns)	$k_F \cdot 10^{-8}$ (s ⁻¹)	$k_D \cdot 10^{-8}$ (s ⁻¹)	$\phi_{D(\text{din})}$	$\phi_{D(\text{tot})}$	ϕ_T^b	τ_T (μs)
(S)-FBP	0.21	1.7	1.24	-	-	-	0.71	24
(S)-TrpMe	0.34	6.4	0.53	-	-	-	n.d.	-
(S,S)-1	0.04	0.9	0.44	9.54	0.87	0.88	0.26	24
(R,S)-1	0.02	0.9	0.22	9.54	0.87	0.94	0.22	24
(S)-TrpOH	0.38	8.1	0.47	-	-	-	n.d.	-
(S,S)-2	0.04	1.1	0.36	7.86	0.87	0.89	0.19	24
(R,S)-2	0.02	1.1	0.18	7.86	0.87	0.95	0.10	24

Tabla 4.1. Propiedades fotofísicas de (S)-FBP, (S)-TrpMe, (S)-TrpOH y de las diadas en acetonitrilo y atmósfera de N₂ ($\lambda_{\text{ex}} = 266$ nm). ^a Medidas realizadas a 310 nm para el caso de (S)-FBP y a 340 nm para el resto de compuestos. ^b n.d.: no detectado.

Los espectros de fluorescencia de las diadas (S,S)-1, (R,S)-1, (S,S)-2 y (R,S)-2 (ver Figuras 4.4 y 4.7) mostraron que la emisión de fluorescencia proviene del Trp ($\lambda_{em} = 340$ nm).¹⁴ Así pues, la constante de desactivación (k_D) para el Trp (ruta (VIII) del Esquema 4.1) viene dada por la ecuación 4.2:

$$k_D = \frac{I}{\tau_F} - \frac{I}{\tau_{F(modelo)}} \quad (4.2)$$

donde τ_F es el tiempo de vida de fluorescencia en la diada y $\tau_{F(modelo)}$ corresponde al tiempo de vida de fluorescencia del modelo (S)-TrpMe (6.4 ns) o (S)-TrpOH (8.1 ns). El valor de k_D para el caso de las diadas (S,S)-1 y (R,S)-1 fue de $9.54 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$, mientras que para las diadas (S,S)-2 y (R,S)-2 el valor obtenido fue de $7.86 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$.

De los valores experimentales ϕ_F y τ_F se pudo determinar la constante de fluorescencia k_F , correspondiente a la ruta (III) del Esquema 4.1, según la ecuación 4.3:

$$k_F = \frac{\phi_F}{\tau_F} \quad (4.3)$$

A partir de los valores de k_F , ϕ_F y k_D anteriormente determinados, se pudo calcular el rendimiento cuántico de desactivación dinámica intramolecular ($\phi_{D(din)}$) según la ecuación 4.4:

$$\phi_{D(din)} = \frac{k_D}{k_F} \phi_F \quad (4.4)$$

El valor de $\phi_{D(din)}$ es idéntico para las cuatro diadas (0.87). Como el Trp absorbe únicamente el 40% de la luz incidente a la longitud de onda de excitación de 266 nm, el valor obtenido de $\phi_{D(din)}$ confirmó la existencia de una transferencia de energía singlete-singlete eficiente desde el FBP al Trp (ruta (II) en Esquema 4.1), que está termodinámicamente favorecida, como se deduce de los valores de las energías relativas de los estados excitados singlete de los cromóforos aislados (99 kcal mol⁻¹ para FBP y 96 kcal mol⁻¹ para Trp). Por otra parte, no se observó diastereodiferenciación en la desactivación del estado excitado singlete del triptófano (¹Trp*). Sin embargo, los espectros de fluorescencia mostrados en las Figuras 4.4 y 4.7 son claramente diferentes entre cada par de diastereómeros. Se pudo calcular el rendimiento cuántico de desactivación total ($\phi_{D(tot)}$) para cada diada a partir del área de los espectros de emisión, según la ecuación 4.5:

$$\phi_{D(tot)} = 1 - \frac{A_{diada}}{A_{modelo}} \quad (4.5)$$

donde A_{diada} es el área bajo la curva de fluorescencia de la diada y A_{modelo} es el área bajo la curva de fluorescencia del TrpMe o TrpOH.

Los valores que se obtuvieron fueron: 0.88 ((S,S)-1), 0.94 ((R,S)-1), 0.89 ((S,S)-2) y 0.95 ((R,S)-2). Claramente se observó que la desactivación *dinámica* y *total* de fluorescencia coincidían en el caso de las diadas (S,S)-, sin embargo fueron algo distintas para las (R,S)-. Esto pudo deberse a la existencia de una desactivación estereoselectiva desde el estado excitado singlete del flurbiprofeno, ¹FBP*, para dar lugar a la formación de excíplejos y/o pares iónicos radicalarios (ruta (VII) del Esquema 4.1). Este proceso resultó ser más importante para los diastereómeros (R,S)- que para los (S,S)-. De hecho, el excíplejo se

detectó tras realizarse la normalización de los espectros de fluorescencia (ver Figuras 4.4. y 4.7), al observarse la aparición de una nueva banda de emisión de baja intensidad entre 380-500 nm, más intensa en el caso de las diadas (R,S)-.

El *mecanismo de desactivación* de fluorescencia del Trp pudo tener lugar bien por transferencia electrónica (TEI) o por formación de exciplexo (EX). Para conocer el mecanismo predominante, se hizo uso de la ecuación de Weller¹⁷ (ecuaciones 4.6.A y B), donde se tuvo en cuenta la energía de singlete del Trp y los potenciales redox del indol (cromóforo del Trp) y del bifenilo (cromóforo del FBP).

$$\Delta G_{TEI} = E_{OX} - E_{RED} - \frac{E_{0-0}}{23.061} + \frac{2.6}{\varepsilon} - 0.13 \quad (4.6.A.)$$

$$\Delta G_{EX} = E_{OX} - E_{RED} - \frac{E_{0-0}}{23.061} - \frac{\mu^2}{\rho^3} \left(\frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - 0.19 \right) + 0.38 \quad (4.6.B.)$$

donde ΔG es la energía libre del proceso a estudiar (TEI o EX), E_{OX} es el potencial de oxidación del triptófano (se tomó como potencial de oxidación el del indol, $E_{OX} = 1.015$ V),¹⁶ E_{RED} es el potencial de reducción del flurbiprofeno (se tomó como potencial de reducción el del bifenilo, $E_{RED} = -2.55$ V),¹⁶ E_{0-0} es la energía del estado excitado singlete del Trp ($E_S = 94$ kcal mol⁻¹),¹⁶ ε es la constante dieléctrica del disolvente (37.5 para el acetonitrilo),¹⁸ y μ^2/ρ^3 tiene un valor promedio de 0.75 eV.

Los valores que se obtuvieron de ΔG indicaron que ambos procesos eran termodinámicamente favorables ($\Delta G_{TEI} = -15$ kcal mol⁻¹ y $\Delta G_{EX} = -10$ kcal mol⁻¹), por lo que la desactivación de la fluorescencia del Trp podía ocurrir tanto por transferencia electrónica como por

formación de exciplojo. Estos valores hubiesen sido 3 kcal mol⁻¹ más negativos si hubieran ocurrido a partir del singlete del FBP, dada la mayor energía de este estado excitado (99 kcal mol⁻¹).¹⁵

Otra propiedad importante a tener en cuenta es el origen del estado excitado triplete del FBP. Para profundizar en este aspecto, se determinó el rendimiento cuántico de formación de triplete (ϕ_T) mediante experimentos de FDL. Para ello se utilizó la ecuación 4.7, lo que permitió obtener el valor de $\phi_{T(diada)}$.

$$\phi_{T(diada)} = \frac{\Delta DO_{diada}}{\Delta DO_{FBP}} \phi_{T(FBP)} \quad (4.7)$$

donde ΔDO_{diada} es la absorbancia de triplete ($\lambda_{m\acute{a}x} = 360$ nm) en la diada, ΔDO_{FBP} es la absorbancia de triplete del FBP, y $\phi_{T(FBP)}$ es el rendimiento cuántico de triplete del FBP aislado ($\phi_{T(FBP)} = 0.71$).¹⁵

Los valores de ϕ_T obtenidos para las diadas están en el rango 0.1-0.3. Utilizando estos valores de ϕ_T , la suma de todos los rendimientos cuánticos superaba la unidad. Por tanto, la generación del estado excitado triplete debía ser posible a través de varios caminos:

✓ Cruce intersistemas desde el estado excitado singlete del FBP ($^1\text{FBP}^*$), correspondiente a la ruta (VI) del Esquema 4.1. Esta posibilidad se descartó, ya que no se detectó emisión de fluorescencia desde el FBP.

✓ Transferencia de energía triplete-triplete desde el $^3\text{Trp}^*$ al $^3\text{FBP}^*$ (ruta (X) del Esquema 4.1). Aunque este proceso es exergónico (ΔG ca. -4 kcal mol⁻¹), su contribución debía ser muy baja, ya que el

rendimiento cuántico de cruce intersistemas de $^1\text{Trp}^*$ a $^3\text{Trp}^*$ en las diadas (ruta (V) del Esquema 4.1) debería ser del mismo orden que ϕ_F (0.04 y 0.02 para las diadas (S,S)- y (R,S)-, respectivamente).

✓ Retrotransferencia electrónica del par de iones radicales (ruta (IX), Esquema 4.1) resultado de la desactivación del estado excitado singlete (ΔG ca. $-12 \text{ kcal mol}^{-1}$). Este mecanismo es probablemente el que más relevancia tiene en la formación del triplete en las diadas.

4.2.2. Estudios fotofísicos de las diadas FBP-Trp en 1,4-dioxano

En disolventes apolares, como 1,4-dioxano ($\epsilon = 2.2$),¹⁸ los procesos de transferencia electrónica se ven más dificultados que en disolventes de mayor polaridad, como el acetonitrilo ($\epsilon = 37.5$).¹⁸ Por ello, las medidas de fluorescencia también se realizaron en 1,4-dioxano. Al igual que cuando se utilizó acetonitrilo como disolvente, el espectro UV-vis de las diadas (S,S)-1, (R,S)-1, (S,S)-2 y (R,S)-2 en 1,4-dioxano (Figura 4.10) fue idéntico al que correspondería a la suma de los espectros del (S)-FBP y del (S)-TrpMe o (S)-TrpOH por separado a la misma concentración, lo que indica la ausencia de una interacción significativa entre las dos moléculas en el estado fundamental.

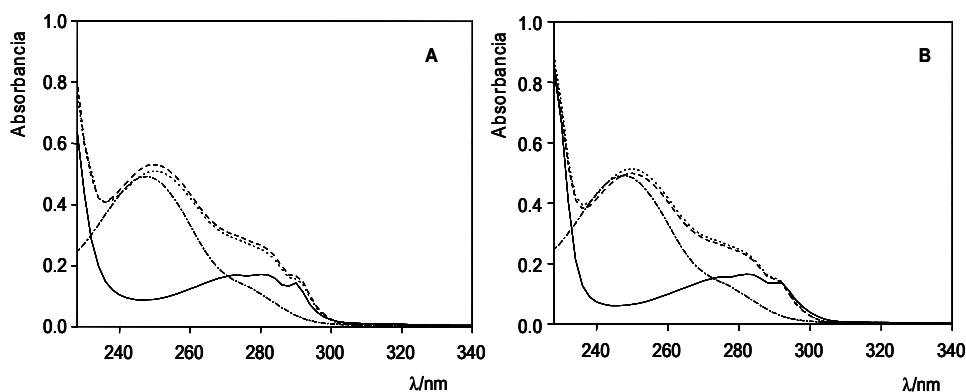


Figura 4.10. **A)** Espectro UV-vis del (S)-FBP (- - - - -), (S)-TrpMe (———), (S,S)-1 (- - -) y (R,S)-1 (······) en 1,4-dioxano a concentración 2.5×10^{-5} M. **B)** Espectro UV-vis del (S)-FBP (- - - - -), (S)-TrpOH (———), (S,S)-2 (- - - - -) y (R,S)-2 (······) en 1,4-dioxano a concentración 2.5×10^{-5} M.

Al igual que ocurría en los experimentos realizados en acetonitrilo, la emisión (obtenida a $\lambda_{ex} = 266$ nm) de las diadas (S,S)-1,

(*R,S*)-1, (*S,S*)-2 y (*R,S*)-2 en 1,4-dioxano muestra una notable desactivación (Figura 4.11).

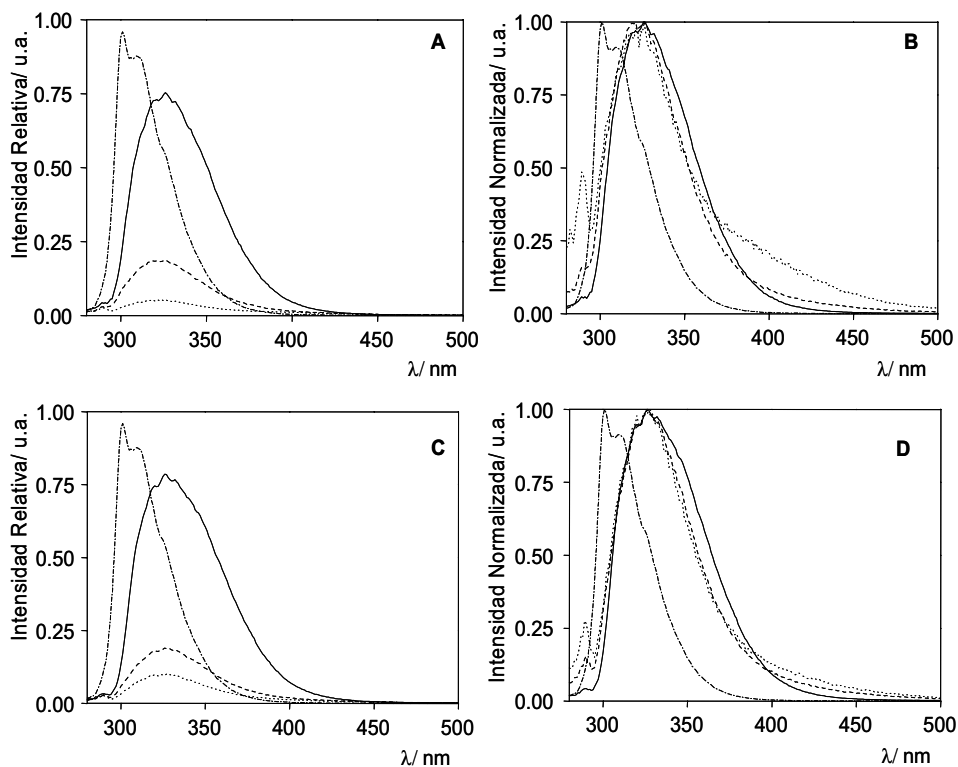


Figura 4.11. **A)** Espectros de fluorescencia y **B)** Espectros normalizados de fluorescencia, todos ellos registrados en 1,4-dioxano/ N_2 a concentración 1.0×10^{-5} M y $\lambda_{ex} = 266$ nm, del (*S*)-FBP (— · — ·), (*S*)-TrpMe (—), (*S,S*)-1 (---) y (*R,S*)-1 (·····). **C)** Espectros de fluorescencia y **D)** Espectros normalizados de fluorescencia, todos ellos registrados en 1,4-dioxano/ N_2 a concentración 1.0×10^{-5} M y $\lambda_{ex} = 266$ nm, del (*S*)-FBP (— · — ·), (*S*)-TrpOH (—), (*S,S*)-2 (---) y (*R,S*)-2 (·····).

La emisión de fluorescencia es debida, principalmente, al cromóforo del Trp, con máximo a 340 nm. Por otra parte, se siguió observando la formación del posible exciplexo (banda entre 380-500 nm, Figura 4.11.B y D). Los tiempos de vida de fluorescencia registrados a 340 nm fueron claramente inferiores en las diadas (entre 1.2 y 1.5 ns)

respecto a los modelos (S)-TrpMe (4.2 ns) o (S)-TrpOH (5.4 ns), indicativo de que la desactivación es dinámica. Los tiempos de vida registrados a 440 nm fueron los mismos para ambos diastereómeros de cada par de diadas (1.9 ns para **1** y 3.0 ns para **2**).

Con respecto a los experimentos de FDL ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$), la banda observada corresponde a la absorción triplete-triplete asignada al FBP.¹⁵ La Figura 4.12 muestra los espectros de absorción y las cinéticas de desactivación de la señal registrada a 360 nm.

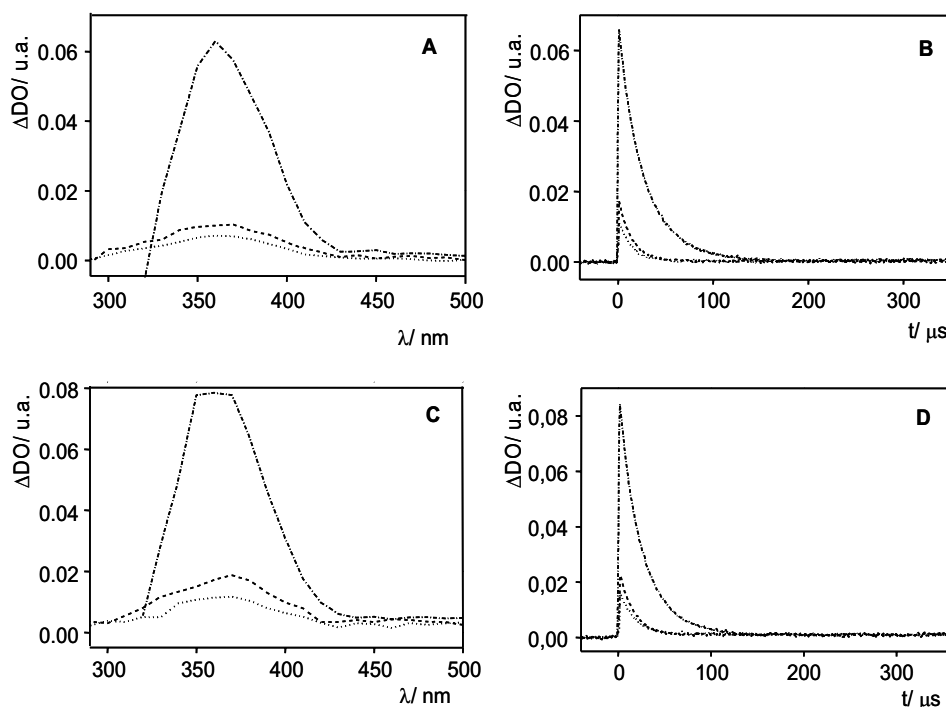


Figura 4.12. FDL del (S)-FBP (---), (S,S)-1 (----) y (R,S)-1 (.....). **A)** Espectro de la especie transitoria obtenida 3 μs después del pulso de láser. **B)** Desactivaciones monitorizadas a 360 nm. FDL del (S)-FBP (---), (S,S)-2 (----) y (R,S)-2 (.....). **C)** Espectro de la especie transitoria obtenida 3 μs después del pulso de láser. **D)** Desactivaciones monitorizadas a 360 nm. Los experimentos se realizaron en 1,4-dioxano/ N_2 a concentración $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ y $\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$.

Los tiempos de vida de triplete ($\lambda_{\text{máx}} = 360 \text{ nm}$) fueron más cortos en las diadas ($\tau_T = 14 \text{ }\mu\text{s}$ para (S,S)-1 y (R,S)-1, y $\tau_T = 17 \text{ }\mu\text{s}$ para (S,S)-2 y (R,S)-2) respecto al FBP libre ($\tau_T = 26 \text{ }\mu\text{s}$). Esto puede deberse a la posible formación de un excíplejo en el estado excitado triplete.

Se determinaron las propiedades fotofísicas de los modelos y de las diadas en 1,4-dioxano, siguiendo el mismo procedimiento que en el estudio realizado en acetonitrilo. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 4.2.

Compuesto	ϕ_F	τ_F^a (ns)	$k_F \cdot 10^{-8}$ (s^{-1})	$k_D \cdot 10^{-8}$ (s^{-1})	$\phi_{D(\text{din})}$	$\phi_{D(\text{tot})}$	ϕ_T^b	τ_T (μs)
(S)-FBP	0.25	1.8	1.38	-	-	-	0.70	26
(S)-TrpMe	0.31	4.2	0.74	-	-	-	n.d.	-
(S,S)-1	0.08	1.2	0.67	5.95	0.71	0.74	0.15	14
(R,S)-1	0.03	1.2	0.25	5.95	0.71	0.88	0.13	14
(S)-TrpOH	0.35	5.4	0.64	-	-	-	n.d.	-
(S,S)-2	0.08	1.5	0.53	4.82	0.73	0.77	0.19	17
(R,S)-2	0.05	1.5	0.33	4.82	0.73	0.86	0.13	17

Tabla 4.2. Propiedades fotofísicas de (S)-FBP, (S)-TrpMe, (S)-TrpOH y de las diadas en 1,4-dioxano y atmósfera de N_2 ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$). ^a Medidas realizadas a 310 nm para el caso de (S)-FBP y a 340 nm para el resto de compuestos. ^b n.d.: no detectado.

La emisión de fluorescencia en 1,4-dioxano también ocurrió exclusivamente desde el cromóforo del Trp ($\lambda_{\text{máx}} = 340 \text{ nm}$). El valor obtenido para k_D de la unidad de Trp (ruta (VIII) del Esquema 4.1) haciendo uso de la ecuación 4.1 fue de $5.95 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ para las diadas 1,

y $4.82 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ para las diadas **2**. A partir de ϕ_F y τ_F , y haciendo uso de la ecuación 4.2, se calculó el valor de k_F (correspondiente a la ruta (III) del Esquema 4.1), cuyos valores se muestran en la Tabla 4.2. Los valores correspondientes al rendimiento cuántico de desactivación dinámica intramolecular ($\phi_{D(\text{din})}$), calculado a partir de la ecuación 4.3, fueron idénticos para cada par de diadas (0.71 para **1** y 0.73 para **2**). De nuevo, como el Trp no está absorbiendo toda la luz, sino sólo el 40% de los fotones incidentes a 266 nm (ver Figura 4.10), el valor de ϕ_D obtenido corrobora la existencia de una eficiente transferencia de energía singlete-singlete desde el FBP al Trp (ruta (II) del Esquema 4.1).

Los espectros de fluorescencia de la Figura 4.11 son diferentes para cada par de diastereómeros. Sin embargo, no se observó una desactivación dinámica estereoselectiva desde $^1\text{Trp}^*$. Se calculó la desactivación total de fluorescencia ($\phi_{D(\text{tot})}$) haciendo uso de la ecuación 4.5. Los valores obtenidos de $\phi_{D(\text{tot})}$ fueron 0.74 y 0.88 ((S,S)-**1** y (R,S)-**1**, respectivamente), y 0.77 y 0.86 ((S,S)-**2** y (R,S)-**2**, respectivamente). Por tanto, la desactivación de fluorescencia *dinámica* y *total* no coincidieron para el caso de las diadas (R,S)-. Este hecho se atribuye a una desactivación estereoselectiva desde $^1\text{FBP}^*$, que conduce a la formación de excíplejos o pares iónicos radicalarios (ruta (VII) del Esquema 4.1).

La aplicación de la ecuación de Weller¹⁷ (ecuaciones 4.6.A y B) teniendo en cuenta la energía de singlete del Trp¹⁶ y los potenciales redox relevantes, permitió realizar el cálculo de ΔG para los procesos de transferencia electrónica (TEI) o formación de excíplejo (EX). Así pues, teniendo en cuenta las consideraciones anteriores y aplicando las ecuaciones 4.6.A y B ($\epsilon = 2.2$ en 1,4-dioxano), los valores de ΔG que se obtuvieron para los procesos de TEI o EX fueron: $\Delta G_{\text{TEI}} = + 10 \text{ kcal mol}^{-1}$

y $\Delta G_{EX} = -6 \text{ kcal mol}^{-1}$, lo que indica que el proceso que está favorecido termodinámicamente es el de formación de exciplexo. La estereodiferenciación observada en las diadas puede ser mayor en 1,4-dioxano por la menor contribución del proceso de transferencia electrónica y el incremento del proceso de formación de exciplexo.

Finalmente, los rendimientos cuánticos de formación de triplete (ϕ_T) determinados por FDL tuvieron un valor entre 0.1 y 0.2, mientras que los valores de $\phi_{D(tot)}$ se encontraron en el rango de 0.7-0.9. En este caso, como la suma $\phi_T + \phi_{D(tot)}$ no excedió la unidad, no parecía tener lugar una retrotransferencia electrónica desde el par de iones radicales para que se forme el triplete correspondiente al FBP. Esto estaría de acuerdo con el hecho de que la transferencia electrónica sea un proceso que no está favorecido termodinámicamente en 1,4-dioxano.

4.2.3. Estudios fotofísicos de las diadas FBP-Tyr en acetonitrilo

Los siguientes sistemas que se estudiaron fueron las diadas formadas entre FBP y Tyr, bien formando un enlace tipo amida entre el fármaco y el éster metílico de la (*S*)-tirosina ((*S*)-TyrMe), o un enlace tipo éster entre el flurbiprofeno y el éster etílico de la *N*-acetil-(*S*)-tirosina (*N*-Ac-(*S*)-TyrEt). La estructura de estos compuestos se muestra en la Figura 4.13.

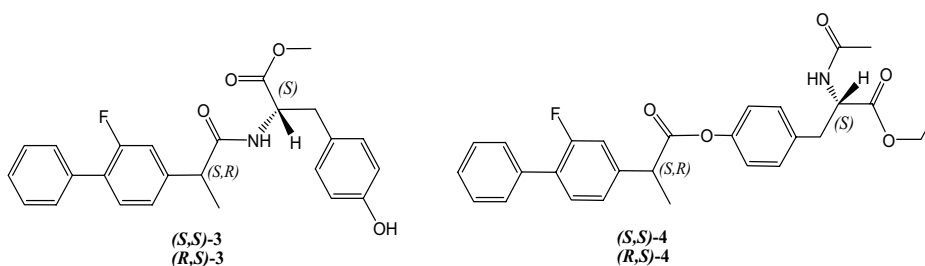


Figura 4.13. Estructura química de las diadas FBP-Tyr unidas por un enlace tipo amida o tipo éster.

El espectro de absorción UV-vis de las diadas (*S,S*)-3 y (*R,S*)-3 fue idéntico al que correspondería de la suma de los espectros del (*S*)-FBP y de (*S*)-TyrMe aislados a la misma concentración (Figura 4.14). Este hecho indica la no existencia de una interacción significativa entre las dos moléculas en el estado fundamental.

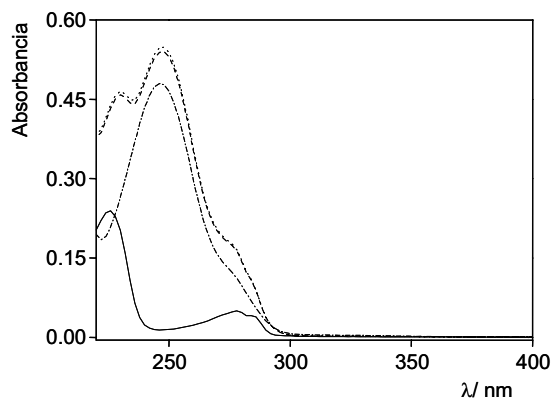


Figura 4.14. Espectro UV-vis del (S)-FBP (· · · · ·), (S)-TyrMe (—), (S,S)-3 (---) y (R,S)-3 (· · · · ·) en acetonitrilo a concentración 2.5×10^{-5} M.

Los espectros de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 266$ nm, N_2) del (S)-FBP y de las diadas (S,S)-3 y (R,S)-3 (Figura 4.15) muestran la banda típica de emisión correspondiente al primer estado excitado singlete del FBP, con máximo a 310 nm.¹⁵

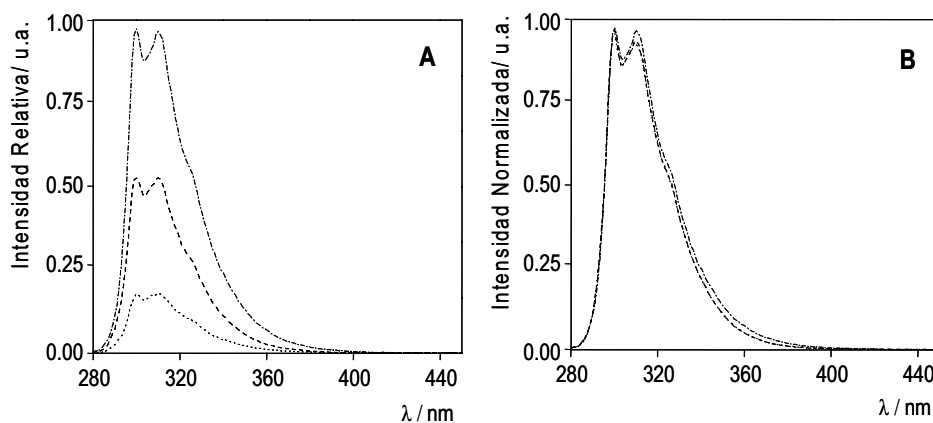


Figura 4.15. A) Espectros de fluorescencia y **B)** Espectros normalizados de fluorescencia, todos ellos registrados en acetonitrilo/ N_2 a concentración 1.0×10^{-5} M y $\lambda_{\text{ex}} = 266$ nm, del (S)-FBP (· · · · ·), (S,S)-3 (---) y (R,S)-3 (· · · · ·).

La disminución de intensidad en las bandas de emisión de las diadas indicó la existencia de una clara desactivación intramolecular. Esta es de naturaleza dinámica, ya que los tiempos de vida de singlete son menores en las diadas (S,S)-**3** y (R,S)-**3** (1.1 y 0.7 ns, respectivamente), que en el FBP (1.7 ns). Además, este proceso es estereoselectivo, con constantes de desactivación k_D de $3.2 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ para el isómero (S,S)- frente a $8.4 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ para el isómero (R,S)-. Estos valores se calcularon haciendo uso de la ecuación 4.2. La aplicación de la ecuación de Weller¹⁷ (ecuaciones 4.6.A y B) permitió estimar los valores de ΔG correspondientes a los procesos de desactivación de TEI o EX. Para ello se tuvo en cuenta la energía de singlete del FBP¹⁵ y los potenciales redox del fenol (cromóforo de la Tyr, $E_{OX} = 1.4 \text{ V}$) y del bifenilo (cromóforo del FBP, $E_{RED} = -2.55 \text{ V}$). Los valores obtenidos de ΔG indican que ambos procesos son exergónicos: $\Delta G_{TEI} = -9 \text{ kcal mol}^{-1}$ y $\Delta G_{EX} = -4 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Con respecto a los experimentos de FDL ($\lambda_{ex} = 266 \text{ nm}$), la banda observada corresponde a la absorción triplete-triplete del FBP ($\lambda_{m\acute{a}x} = 360 \text{ nm}$).¹⁵ La Figura 4.16 muestra los espectros de absorción y las cinéticas de desactivación de la señal a 360 nm.

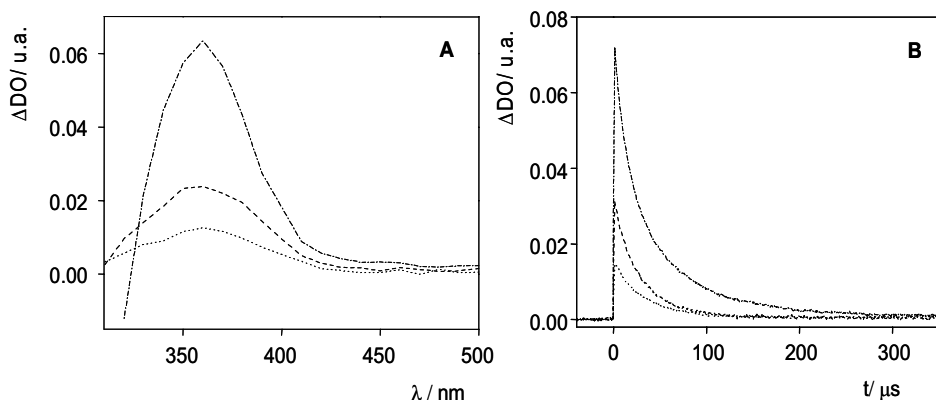


Figura 4.16. FDL del (S)-FBP (---), (S,S)-3 (----) y (R,S)-3 (·····). **A)** Espectro de la especie transitoria obtenida 5 μs después del pulso de láser. **B)** Desactivaciones monitorizadas a 360 nm. Los experimentos se realizaron en MeCN/N₂ a concentración 2.5×10^{-5} M y $\lambda_{\text{ex}} = 266$ nm.

La disminución en la intensidad de la señal de absorbancia de triplete viene dada como resultado de la desactivación del singlete observada previamente en la fluorescencia, donde se sigue manteniendo la estereoselectividad. De las cinéticas de desactivación de triplete se determinó que los tiempos de vida en las diadas no cambian con respecto al FBP aislado (ca. 24 μs). Este fenómeno es indicativo de la ausencia de interacción intramolecular en las diadas desde el estado excitado triplete.

Finalmente se estudiaron sistemas en los que FBP y Tyr están covalentemente unidos mediante un enlace tipo éster (ver Figura 4.13). Los espectros de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 266$ nm) del (S)-FBP y de las diadas (S,S)-4 y (R,S)-4 en acetonitrilo mostraron un máximo de emisión a 310 nm, correspondiente a la emisión del primer estado excitado singlete del FBP.¹⁵ Para estas diadas, no se observó un proceso de desactivación de fluorescencia. Así pues, las intensidades de emisión y los tiempos de vida son muy similares para (S)-FBP y las

diadas (S,S)-**4** y (R,S)-**4** ($\tau_F = 1.7$ ns) en el disolvente empleado. En este caso, los procesos de transferencia electrónica o formación de exciplexo son inhibidos como consecuencia de la disminución de densidad electrónica en el anillo fenólico debido a la acilación. La Figura 4.17 muestra los espectros de fluorescencia y de FDL del (S)-FBP y de las diadas (S,S)-**4** y (R,S)-**4**.

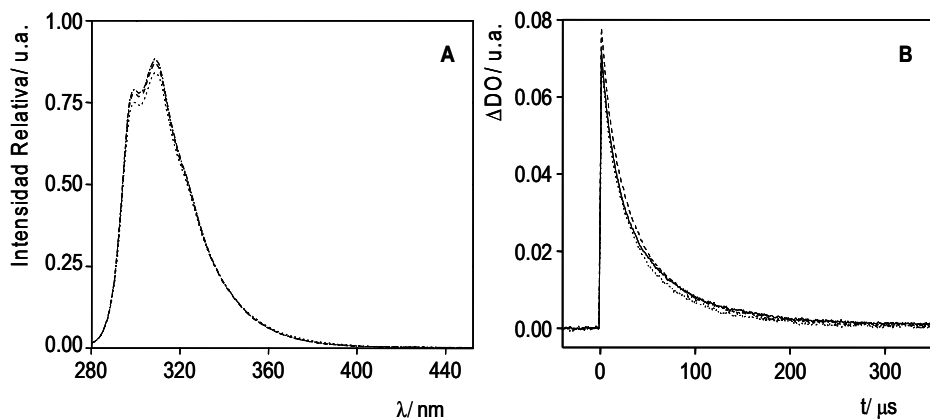


Figura 4.17. A) Espectros de fluorescencia y **B)** Desactivaciones monitorizadas a 360 nm del (S)-FBP (·····), (S,S)-**4** (- - - -) y (R,S)-**4** (·········). Los experimentos se realizaron en MeCN/N₂ a concentración 2.5×10^{-5} M y $\lambda_{ex} = 266$ nm.

Los experimentos de FDL mostraron únicamente la señal asignada a la absorción triplete-triplete del FBP, donde la intensidad de la señal para las diadas (S,S)-**4** y (R,S)-**4** fue igual que para el (S)-FBP. Como era de esperar, los tiempos de vida de triplete obtenidos para ambas diadas no variaron con respecto al del (S)-FBP (ca. 24 μs).

4.2.4. Estudios fotofísicos de las diadas FBP-Tyr en 1,4-dioxano

Con el propósito de minimizar el proceso de transferencia electrónica y favorecer el de formación de excíplejo, los estudios de fluorescencia y de FDL también se realizaron en 1,4-dioxano.

De los espectros UV-vis, nuevamente se concluyó que no existía una interacción significativa entre los dos cromóforos en el estado fundamental, ya que el espectro de absorción UV-vis de las diadas (S,S)-**4** y (R,S)-**4** fue idéntico al que correspondería de la suma de los espectros del (S)-FBP y de (S)-TyrMe aislados a la misma concentración.

En este disolvente también se observó una desactivación estereoselectiva en la fluorescencia de las diadas (S,S)-**3** y (R,S)-**3**, aunque en un orden menor (Figura 4.18).

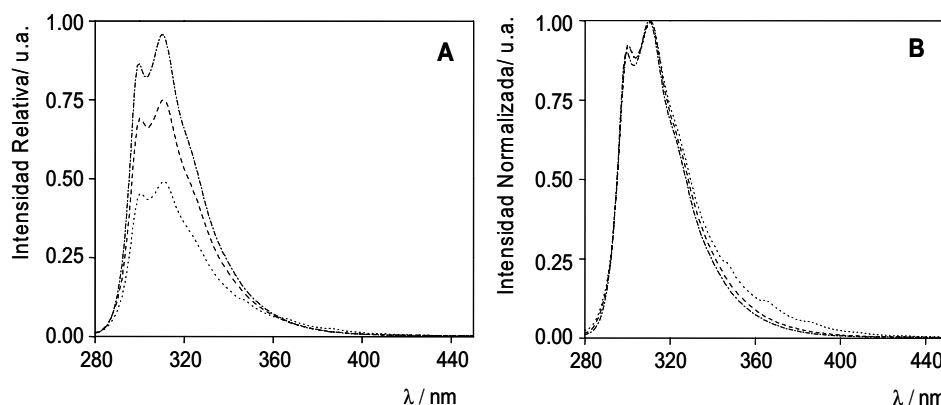


Figura 4.18. **A)** Espectros de fluorescencia y **B)** Espectros normalizados de fluorescencia, todos ellos registrados en 1,4-dioxano/N₂ a concentración 1.0×10^{-5} M y $\lambda_{\text{ex}} = 266$ nm, del (S)-FBP (— · — · —), (S,S)-**3** (---) y (R,S)-**3** (.....).

De nuevo, los tiempos de vida de singlete fueron menores en las diadas que en el (S)-FBP ($\tau_F = 1.8$ ns), obteniéndose valores de $\tau_F = 1.6$ ns para la diada (S,S)-**3**, y $\tau_F = 1.2$ ns para la diada (R,S)-**3**. Así pues, se observó estereodiferenciación en el proceso de desactivación intramolecular, con valores de k_D de 6.9×10^7 s⁻¹ para el diastereómero (S,S)- y de 2.8×10^8 s⁻¹ para el diastereómero (R,S)-.

A la hora de determinar el mecanismo de desactivación de fluorescencia (haciendo uso de la ecuación de Weller), se observó que el proceso de transferencia electrónica era termodinámicamente desfavorable ($\Delta G_{TEI} = +16$ kcal mol⁻¹), mientras que el proceso de formación de exciplexo ($\Delta G_{EX} = 0$ kcal mol⁻¹) podría ser el que operase en 1,4-dioxano. Aunque se observó un pequeño aumento en la emisión de fluorescencia a longitudes de onda mayores de 350 nm, esta no mostró evidencias claras sobre la formación de exciplexo.

Los experimentos de FDL de nuevo mostraron la señal correspondiente a la absorción triplete-triplete asignada al FBP (Figura 4.19).

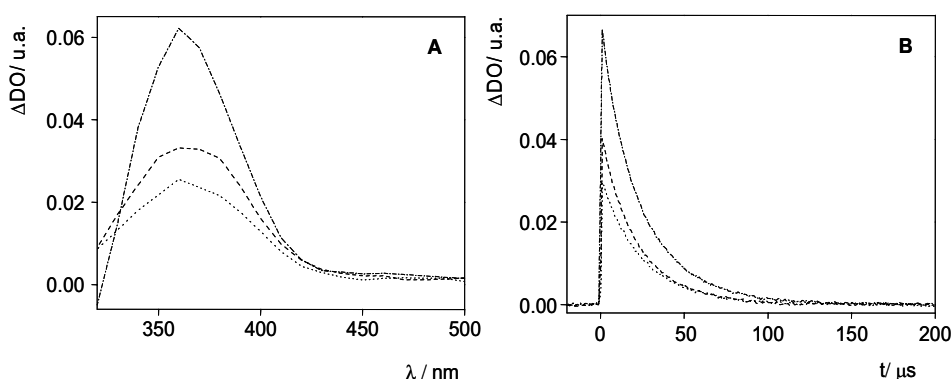


Figura 4.19. FDL del (S)-FBP (---), (S,S)-**3** (- · - · -) y (R,S)-**3** (.....). **A)** Espectro de la especie transitoria obtenida 5 μs después del pulso de láser. **B)** Desactivaciones monitorizadas a 360 nm. Los experimentos se realizaron en 1,4-dioxano/N₂ a concentración 2.5×10^{-5} M y $\lambda_{ex} = 266$ nm.

Nuevamente se observó que la disminución en la intensidad de la señal de triplete era causada por la desactivación previa del estado excitado singlete, en la que se siguió manteniendo la estereoselectividad inicial observada. Además, los tiempos de vida de triplete en las diadas no cambiaron con respecto al FBP aislado (ca. 26 μ s). Por tanto, no se observó una interacción intramolecular significativa desde el estado excitado triplete.

Finalmente, se realizaron los estudios de fluorescencia y FDL para las diadas (S,S)-**4** y (R,S)-**4** en 1,4-dioxano, en atmósfera de nitrógeno. Como era de esperar, no se observó desactivación de la fluorescencia para las diadas, así como ningún tipo de interacción significativa desde el estado excitado triplete.

4.3. Conclusiones

El primer estado excitado singlete del FBP en las diadas FBP-a.a. estudiadas fue altamente sensible a la naturaleza del aminoácido y al medio en el que se encuentra.

Para el caso de los sistemas FBP-Trp, los principales resultados obtenidos fueron:

1.- Prácticamente todos los fotones que provienen de la radiación incidente a 266 nm alcanzan el estado excitado singlete del triptófano ($^1\text{Trp}^*$), bien por absorción directa de este cromóforo o por transferencia de energía singlete-singlete desde el FBP.

2.- Tiene lugar una desactivación estereoselectiva desde $^1\text{FBP}^*$ que condujo a la formación de exciplejos detectables por el uso de la técnica de fluorescencia.

3.- El $^1\text{Trp}^*$ obtenido por transferencia de energía singlete-singlete del FBP sufre una desactivación intramolecular por un proceso de transferencia electrónica.

4.- El primer estado excitado triplete del FBP se genera bien por transferencia de energía triplete-triplete desde el $^3\text{Trp}^*$ o por retrotransferencia electrónica desde el par iónico radicalario.

En las diadas FBP-Tyr los procesos fotofísicos de mayor relevancia fueron:

1.- Emisión de fluorescencia desde el estado excitado singlete del FBP.

2.- Desactivación intramolecular estereoselectiva del primer estado excitado singlete del flurbiprofeno. En medio polar, los procesos de desactivación posibles son transferencia electrónica o formación de exciplejo, mientras que en un medio apolar, el proceso de desactivación es formación de exciplejo, la única favorecida termodinámicamente.

Finalmente, en general, en ninguno de los sistemas FBP-a.a. se observa una interacción significativa que involucre el estado excitado triplete, aunque en el caso de las diadas entre FBP y TrpMe o TrpOH en 1,4-dioxano se puede asumir la formación de un exciplexo triplete.

4.4. Parte experimental

4.4.1. Materiales y disolventes

El (S)- y (R)-Flurbiprofeno, el hidrocloreuro del éster metílico del (S)-triptófano, el (S)-triptofanol, el hidrocloreuro del éster metílico de la (S)-tirosina, el éster etílico de la N-acetil-(S)-tirosina, la EDC (hidrocloreuro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) y el BtOH (1-hidroxibenzotriazol) fueron adquiridos de Aldrich. Los disolventes utilizados (metanol, 1,4-dioxano, acetato de etilo, diclorometano y acetonitrilo) son de grado espectroscópico y fueron adquiridos de Scharlau.

4.4.2. General

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono (RMN-¹H y RMN-¹³C) se realizaron usando cloroformo deuterado, con TMS como referencia, para las diadas (S,S)-1, (R,S)-1, (S,S)-3, (R,S)-3, (S,S)-4 y (R,S)-4, y metanol deuterado (CD₃OD) para las diadas (S,S)-2 y (R,S)-2, tomando como referencia la señal correspondiente al metanol a 3.3 ppm (quintuplete).

La purificación de los productos se llevó a cabo por cromatografía preparativa de gel de sílice Merck, usando una mezcla acetato de etilo/hexano como eluyente. Posteriormente se llevó a cabo la cristalización del producto en una mezcla diclorometano/hexano.

4.4.3. Medidas de fluorescencia

Los espectros de fluorescencia registrados en estado estacionario y en atmósfera de nitrógeno, así como las medidas de tiempos de vida de fluorescencia, se realizaron purgando la disolución durante 15 minutos con N₂. En el caso de los espectros de emisión, todas las muestras tenían la misma absorbancia (inferior a 0.1) a la longitud de onda de excitación. Las medidas se realizaron en una cubeta de cuarzo de 10 x 10 mm², con una capacidad de 4 mL. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

4.4.4. Medidas de fotólisis de destello láser

Los experimentos de FDL se realizaron a una longitud de onda de excitación de 266 nm, con una potencia de 4 mJ por pulso de láser. Las disoluciones, medidas en atmósfera de N₂, fueron purgadas 30 minutos antes de la realización del experimento. La absorbancia de las muestras a la longitud de onda de excitación se mantuvo a 0.2. Las medidas se realizaron en una cubeta de cuarzo de 10 x 10 mm², con una capacidad de 4 mL. Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

4.4.5. Síntesis de las diadas

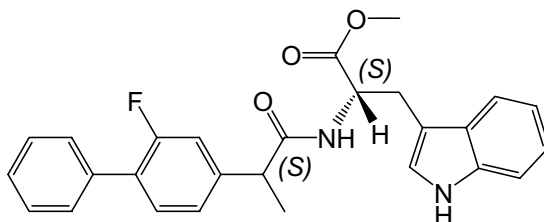
✓ *Sistemas FBP-Trp y FBP-TrpOH*

Sobre una disolución de (*S*)- o (*R*)-flurbiprofeno (0.8 mmoles) en dimetilsulfóxido (DMSO), 10 mL, se añadió poco a poco una disolución de EDC (0.8 mmoles, 1 mL) en DMSO y BtOH (0.8 mmoles, 1 mL) en DMSO. La mezcla se mantuvo en agitación, y sobre esta se añadió gota a gota una disolución de (*S*)-TrpMe o (*S*)-TrpOH (0.8 mmoles, 2 mL) en DMSO. Pasadas 3 horas, se añadieron 75 mL de agua sobre la mezcla de reacción, observándose la precipitación de un sólido blanco, que fue filtrado y disuelto en diclorometano (DCM). La disolución resultante se lavó con NaHCO₃ diluido, HCl 1M, disolución saturada de NaCl y se secó con MgSO₄. El disolvente orgánico fue destilado en bomba de vacío, y el crudo resultante se purificó por cromatografía preparativa de gel de sílice. Finalmente se llevó a cabo una segunda purificación por recristalización.

✓ *Sistemas FBP-Tyr*

Sobre una disolución de (*S*)- o (*R*)-flurbiprofeno (0.8 mmoles) en acetonitrilo (10 mL) se añadió poco a poco una disolución de EDC (0.8 mmoles, 1 mL) y BtOH (0.8 mmoles, 1 mL) en acetonitrilo. Sobre esta, se añadió gota a gota una disolución de (*S*)-TyrMe o N-Ac-(*S*)-TyrEt en acetonitrilo. Pasadas 3 horas, el disolvente orgánico fue eliminado en bomba de vacío. El crudo resultante fue disuelto en diclorometano y lavado con NaHCO₃ diluido, HCl 1M, disolución saturada de NaCl. Finalmente se realizó una purificación por cromatografía preparativa de gel de sílice, y una posterior purificación por recristalización.

Éster metílico del N-[2-(S)-(2-Fluoro[1,1'-bifenil]-4-il)-propanoil]-(S)-triptófano, (S,S)-1.



Rendimiento: 73%.

Purificación: cromatografía preparativa (DCM/Acetato de etilo).

Estado físico: cristalino.

Temperatura de fusión: 130-134 °C.

Espectro de absorción UV λ_{\max} (log ϵ): 222 (4.5), 248 (4.2), 280 hombro (3.9), 290 hombro (3.7).

Espectro de IRTF ν : 3408, 3059, 2976, 2951, 2922, 1736, 1653, 1543, 1282, 1219, 744, 698.

Espectro de masas m/z (%): 79.2 (11%), 130.3 (100%), 201.3 (34%).

Espectro de RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 8.02 (s, 1H), 7.54-6.99 (m, 12H), 6.83 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 5.95 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 4.93-4.87 (m, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.51 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz), 3.38-3.24 (m, 2H), 1.51 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz).

Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 173.4, 172.4, 161.6, 158.3, 142.5, 142.4, 136.3, 135.7, 131.2, 129.2, 128.8, 128.0, 127.9, 123.9, 122.8, 122.6, 120.0, 118.8, 115.8, 115.4, 111.6, 110.2, 53.3, 52.6, 46.8, 27.6, 18.5.

Análisis elemental: para C₂₇H₂₅FN₂O₃.

Calculado: C 72.96; H 5.67; N 6.30.

Experimental: C 72.62; H 5.73; N 6.10.

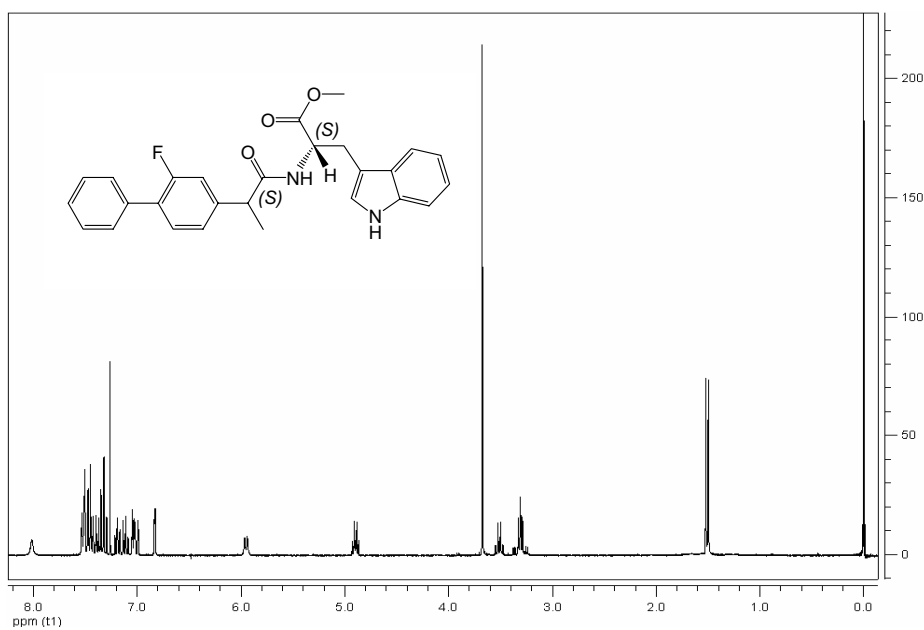


Figura 4.20. RMN- ^1H de la diada *(S,S)*-1, CDCl_3 .

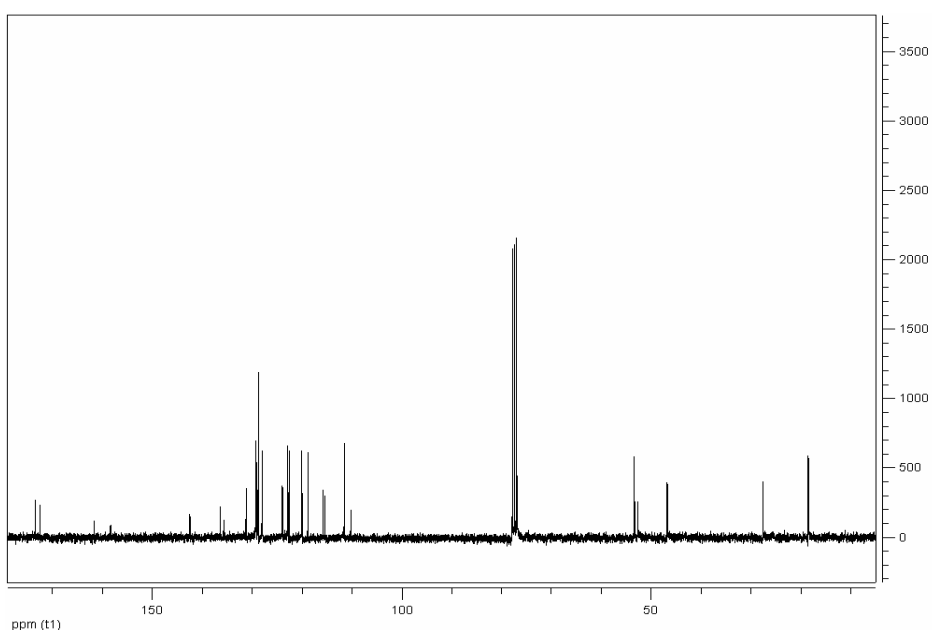
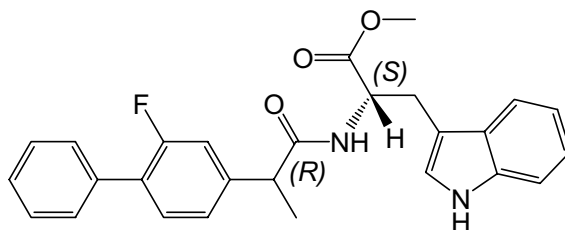


Figura 4.21. RMN- ^{13}C de la diada *(S,S)*-1, CDCl_3 .

Éster metílico del N-[2-(R)-(2-Fluoro[1,1'-bifenil]-4-il)-propanoil]-(S)-triptófano, (R,S)-1.



Rendimiento: 75%.

Purificación: cromatografía preparativa (DCM/Acetato de etilo).

Estado físico: cristalino.

Temperatura de fusión: 132-135 °C.

Espectro de absorción UV λ_{\max} (log ϵ): 222 (4.5), 248 (4.2), 280 hombro (3.9), 290 hombro (3.7).

Espectro de IRTF ν : 3406, 3055, 3002, 2976, 2952, 2935, 1722, 1651, 1523, 1211, 764, 737, 700.

Espectro de masas m/z (%): 79.2 (14%), 130.3 (100%), 201.3 (33%).

Espectro de RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 7.95 (s, 1H), 7.58-7.01 (m, 12H), 6.62 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 5.96 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 4.98-4.92 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.51 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz), 3.31-3.18 (m, 2H), 1.48 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz).

Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 172.8, 172.3, 161.3, 158.0, 142.6, 142.5, 136.0, 135.4, 130.9, 129.0, 128.9, 128.5, 127.7, 123.6, 122.6, 122.3, 119.7, 118.4, 115.5, 115.2, 111.2, 109.7, 52.7, 52.4, 46.5, 27.4, 18.4.

Análisis elemental: para C₂₇H₂₅FN₂O₃.

Calculado: C 72.96; H 5.67; N 6.30.

Experimental: C 72.60; H 5.70; N 6.13.

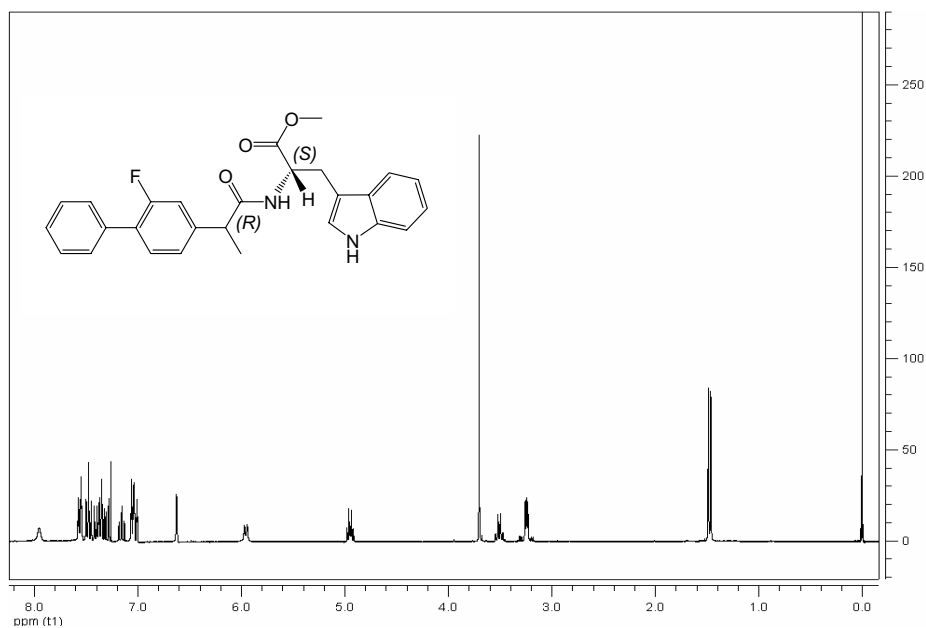


Figura 4.22. RMN- 1H de la diada (R,S) -1, $CDCl_3$.

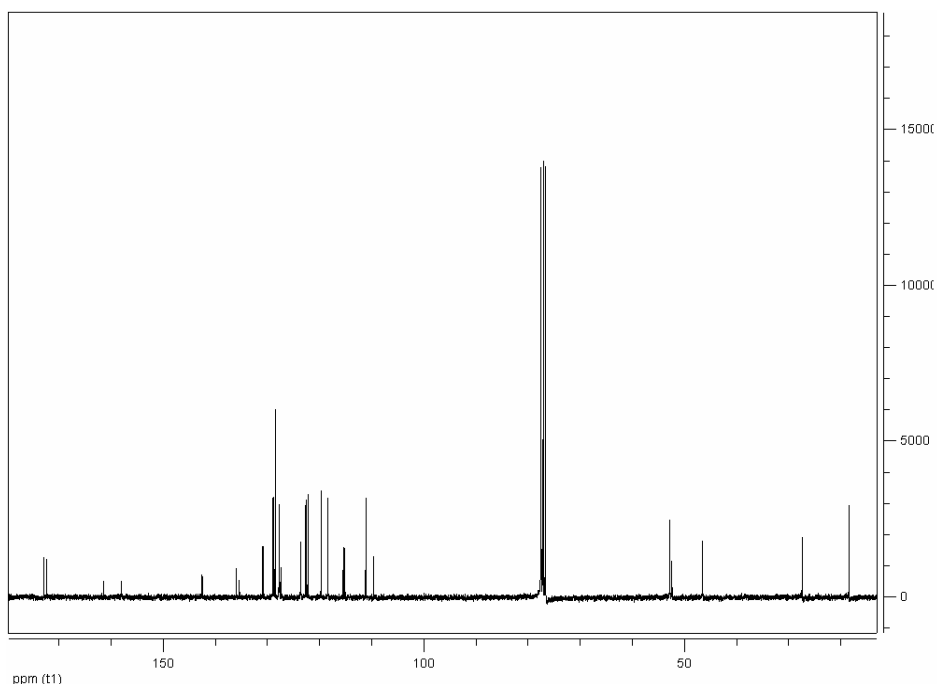
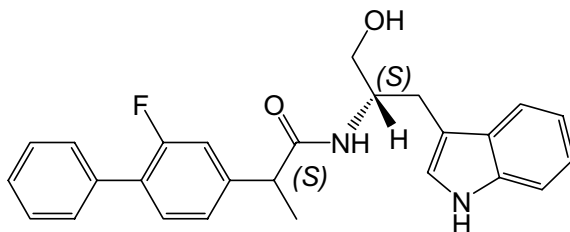


Figura 4.23. RMN- ^{13}C de la diada (R,S) -1, $CDCl_3$.

***N*-[2-(*S*)-(2-Fluoro[1,1'-bifenil]-4-il)-propanoil]-(*S*)-triptofanol,
(*S,S*)-2.**



Rendimiento: 75%.

Purificación: cromatografía preparativa (DCM/Acetato de etilo).

Estado físico: cristalino.

Temperatura de fusión: 142-144 °C.

Espectro de absorción UV λ_{\max} (log ϵ): 223 (4.4), 248 (4.1), 280
hombro (3.8), 290 hombro (3.6).

Espectro de IRTF ν : 3411, 1645, 1556, 1457, 1414, 742, 698.

Espectro de RMN-¹H (CD₃OD) δ (ppm): 7.64-6.97 (m, 13H),
4.25-4.16 (m, 1H), 3.62 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz), 3.53 (d, 2H, $J = 5.4$ Hz), 3.07
(dd, 1H, $J_1 = 14.5$ Hz, $J_2 = 6.0$ Hz), 2.92 (dd, 1H, $J_1 = 14.5$ Hz, $J_2 = 6.9$
Hz), 1.34 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz).

Espectro de RMN-¹³C (CD₃OD) δ (ppm): 175.2, 161.4, 158.1,
143.7, 143.6, 137.0, 135.9, 130.6, 130.4, 130.5, 128.8, 128.3, 127.5,
123.6, 122.9, 121.2, 118.5, 118.4, 115.1, 111.2, 111.1, 63.2, 52.5, 45.9,
26.5, 17.7.

Análisis elemental: para C₂₇H₂₅FN₂O₃.

Calculado: C 72.96; H 5.67; N 6.30.

Experimental: C 72.62; H 5.73; N 6.10.

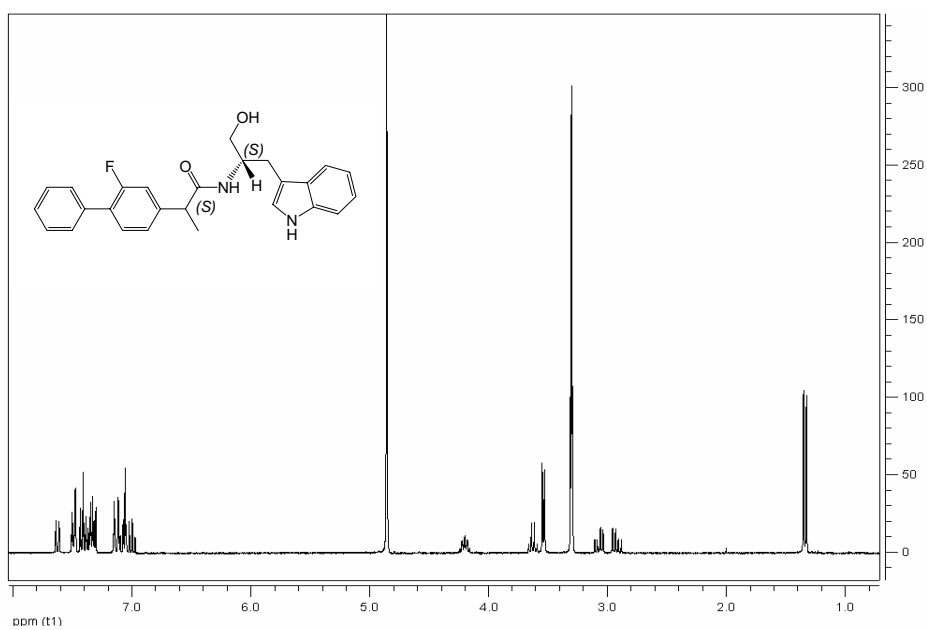


Figura 4.24. RMN-¹H de la diada (S,S)-2, CD₃OD.

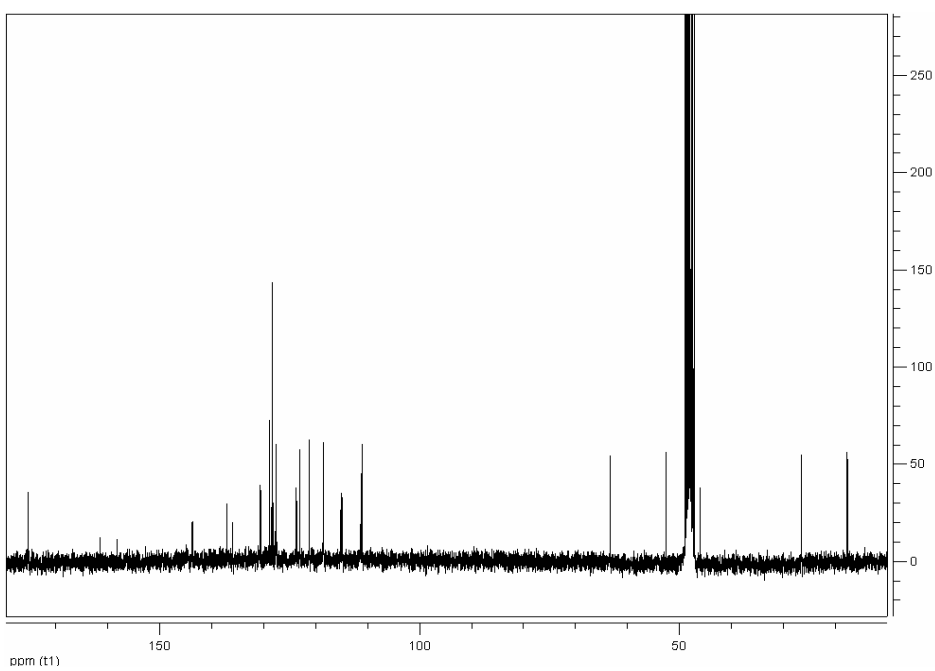
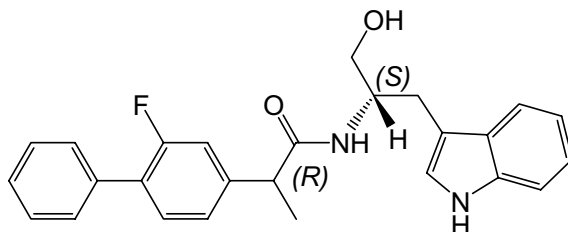


Figura 4.25. RMN-¹³C de la diada (S,S)-2, CD₃OD.

***N*-[2-(*R*)-(2-Fluoro[1,1'-bifenil]-4-il)-propanoil]-(*S*)-triptofanol,
(*R,S*)-2.**



Rendimiento: 73%.

Purificación: cromatografía preparativa (DCM/Acetato de etilo).

Estado físico: cristalino.

Temperatura de fusión: 143-145 °C.

Espectro de absorción UV λ_{\max} (log ϵ): 223 (4.4), 248 (4.1), 280
hombro (3.8), 290 hombro (3.6).

Espectro de IRTF ν : 3367, 3051, 1633, 1529, 1485, 1419,
766, 741, 702.

Espectro de RMN-¹H (CD₃OD) δ (ppm): 7.53-6.89 (m, 13H),
4.29-4.21 (m, 1H), 3.67-3.53 (m, 3H), 2.97 (dd, 1H, $J_1 = 15.0$ Hz, $J_2 =$
6.3 Hz), 2.85 (dd, 1H, $J_1 = 15.0$ Hz, $J_2 = 7.8$ Hz), 1.42 (d, 3H, $J = 7.2$
Hz).

Espectro de RMN-¹³C (CD₃OD) δ (ppm): 176.6, 162.9, 159.6,
145.1, 145.0, 138.4, 137.4, 132.1, 132.0, 130.4, 129.8, 129.4, 129.0,
125.0, 124.5, 122.6, 119.9, 119.8, 116.4, 116.1, 112.5, 64.9, 53.8, 47.3,
27.9, 19.1.

Análisis elemental: para C₂₇H₂₅FN₂O₃.

Calculado: C 72.96; H 5.67; N 6.30.

Experimental: C 72.62; H 5.73; N 6.10.

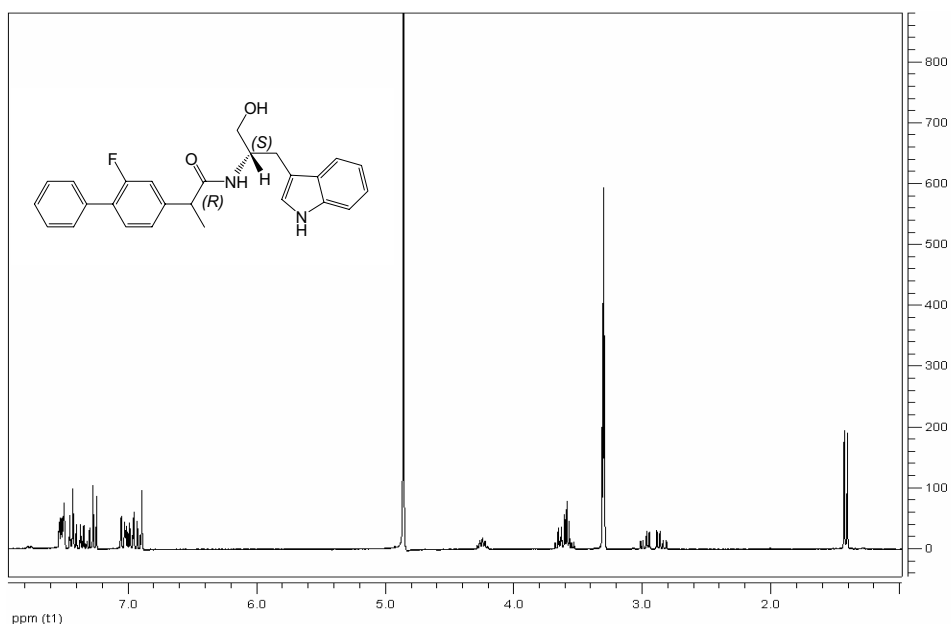


Figura 4.26. RMN-¹H de la diada (R,S)-2, CD₃OD.

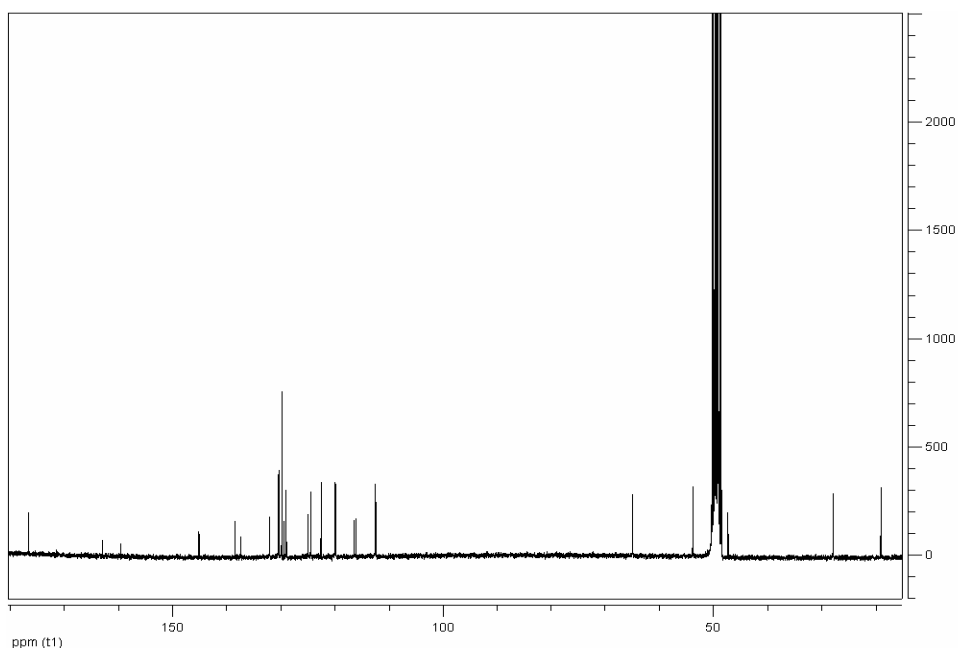
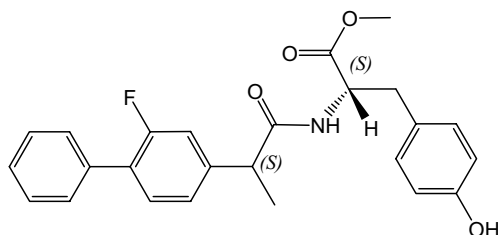


Figura 4.27. RMN-¹³C de la diada (R,S)-2, CD₃OD.

Ester metílico de la N-[2-(S)-(2-fluoro[1,1'-bifenil]-4-il)-propanoil]-(S)-tirosina, (S,S)-3.



Rendimiento: 85 %.

Purificación: cromatografía preparativa (DCM/Acetato de etilo).

Estado físico: cristalino.

Temperatura de fusión: 125-128 °C.

Espectro de absorción UV λ_{\max} (log ϵ): 230 (4.2), 248 (4.3), 276 hombro (3.8).

Espectro de IRTF ν ; 3408, 3062, 3032, 2973, 2952, 2931, 1743, 1653, 1516, 1220, 831, 767, 698.

Espectro de masas m/z (%): 79.2 (15%), 107.2 (91%), 136.2 (11%), 147.2 (15%), 178.2 (100%), 199.1 (62%), 244.4 (26%).

Espectro de RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 7.54-7.34 (m, 6H), 7.08-7.01 (m, 2H), 6.84-6.82 (AA'BB', 4H), 5.98 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 4.85-4.78 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.58 (q, 1H, J = 7.2 Hz), 3.05 (dd, 1H, J_1 = 14.0 Hz, J_2 = 5.4 Hz), 2.92 (dd, 1H, J_1 = 14.0 Hz, J_2 = 6.3 Hz), 1.51 (d, 3H, J = 7.2 Hz).

Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 173.9, 172.4, 161.7, 158.4, 155.7, 142.0, 135.6, 131.4, 130.5, 129.2, 128.8, 128.4, 128.0, 127.2, 123.9, 115.8, 115.5, 53.5, 52.7, 46.8, 37.2, 18.4.

Análisis elemental: para C₂₅H₂₄FNO₄.

Calculado: C 71.24; H 5.74; N 3.32.

Experimental: C 70.78; H 5.88; N 3.36.

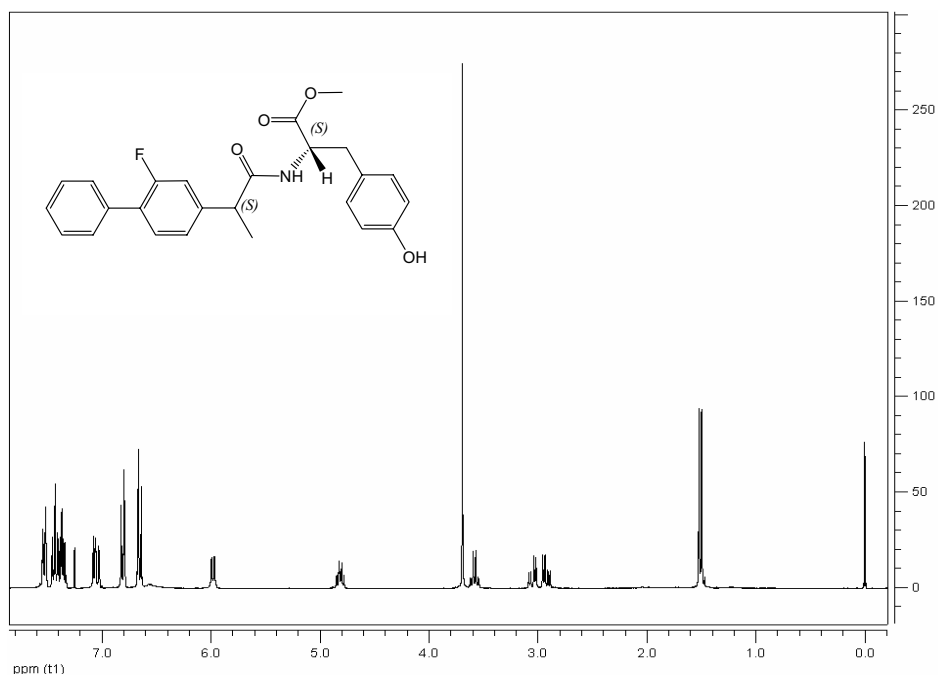


Figura 4.28. RMN-¹H de la diada (S,S)-3, CDCl₃.

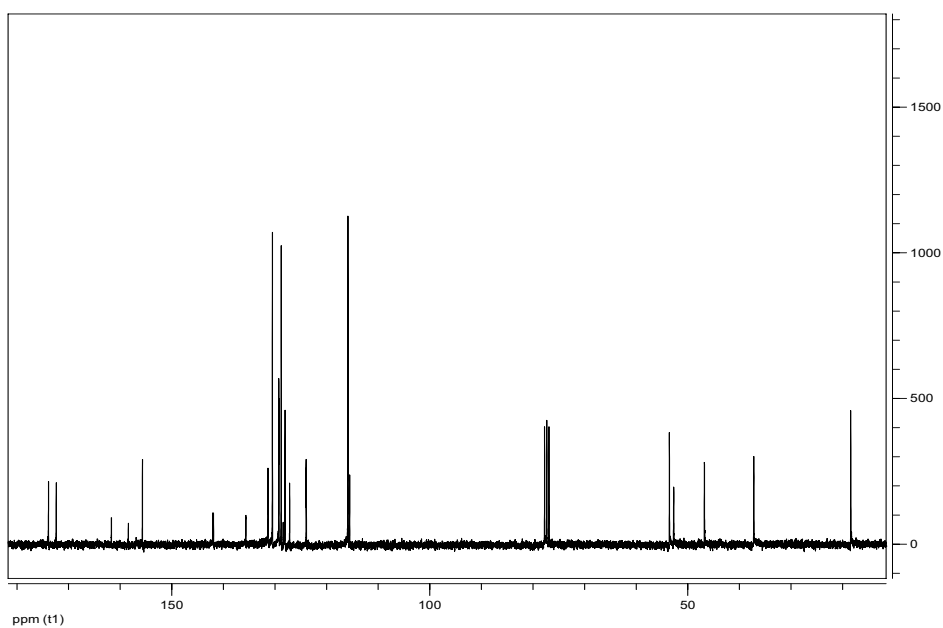
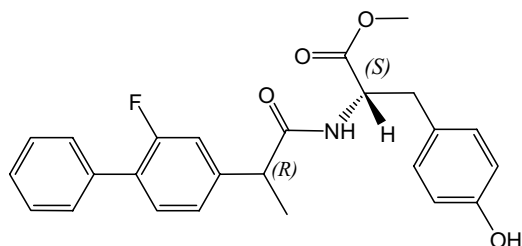


Figura 4.29. RMN-¹³C de la diada (S,S)-3, CDCl₃.

Ester metílico de la N-[2-(R)-(2-fluoro[1,1'-bifenil]-4-il)-propanoil]-(S)-tirosina, (R,S)-3.



Rendimiento: 83 %.

Purificación: cromatografía preparativa (DCM/Acetato de etilo).

Estado físico: cristalino.

Temperatura de fusión: 124-128 °C.

Espectro de absorción UV λ_{\max} (log ϵ): 230 (4.2), 248 (4.3), 276 hombro (3.8).

Espectro de IRTF ν ; 3398, 3026, 2985, 2958, 2931, 1722, 1664, 1516, 1219, 827, 769, 698.

Espectro de masas m/z (%): 79.2 (17%), 107.2 (83%), 136.2 (9%), 147.2 (15%), 178.2 (100%), 199.1 (67%), 244.4 (26%).

Espectro de RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 7.60-7.34 (m, 6H), 7.10-7.00 (m, 2H), 6.66-6.54 (AA'BB', 4H), 5.94 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 4.90-4.84 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.54 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz), 2.97 (dd, 1H, $J_1 = 14.1$ Hz, $J_2 = 5.4$ Hz), 2.87 (dd, 1H, $J_1 = 14.1$ Hz, $J_2 = 6.0$ Hz), 1.48 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz).

Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 173.4, 172.6, 161.7, 158.4, 155.5, 142.5, 135.6, 131.4, 130.5, 129.3, 128.8, 128.4, 128.1, 127.0, 123.9, 115.7, 115.4, 53.3, 52.8, 46.7, 37.2, 18.3.

Análisis elemental: para C₂₅H₂₄FNO₄.

Calculado: C 71.24; H 5.74; N 3.32.

Experimental: C 70.98; H 5.75; N 3.46.

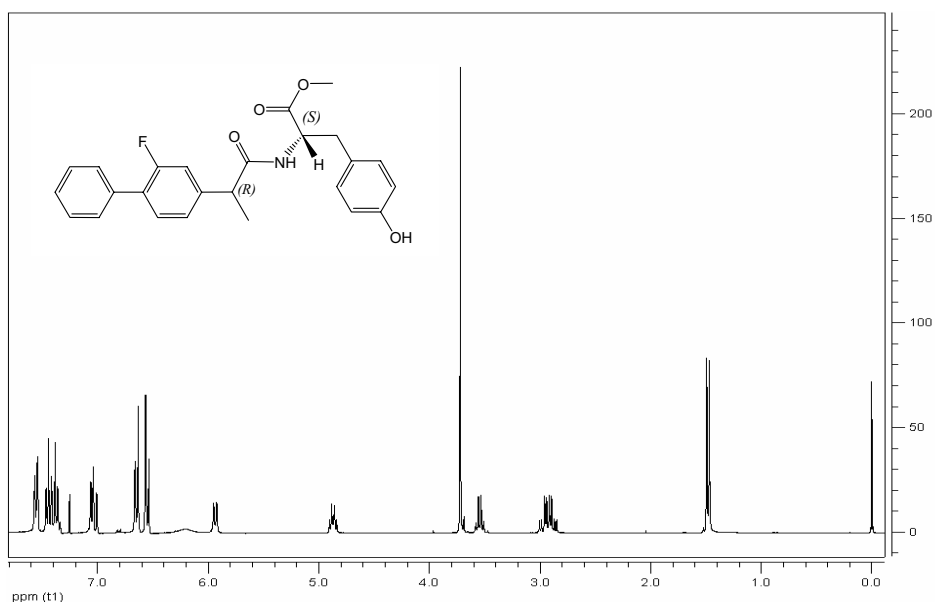


Figura 4.30. RMN-¹H de la diada (R,S)-3, CDCl₃.

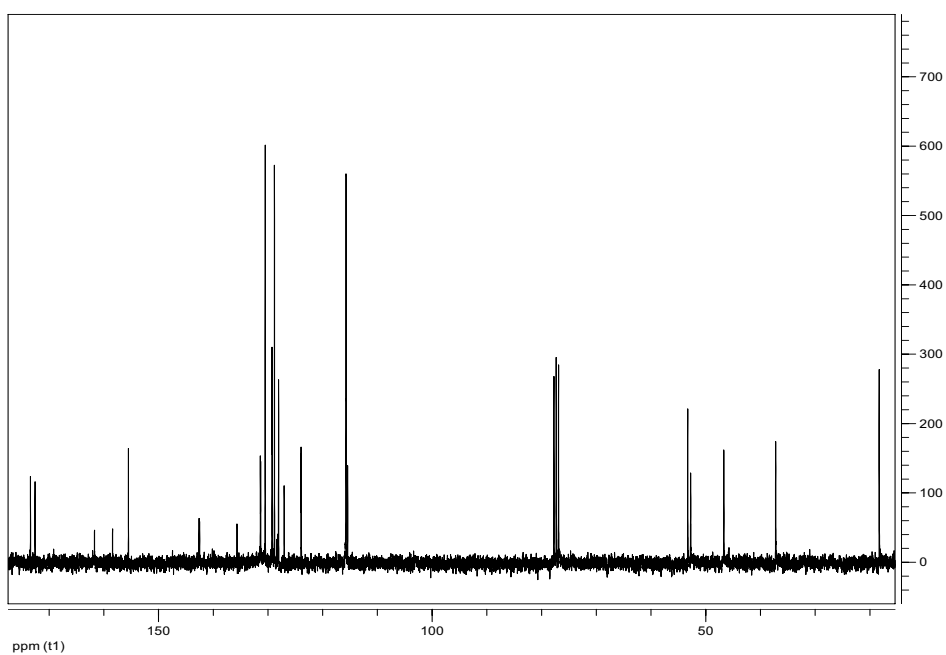


Figura 4.31. RMN-¹³C de la diada (R,S)-3, CDCl₃.

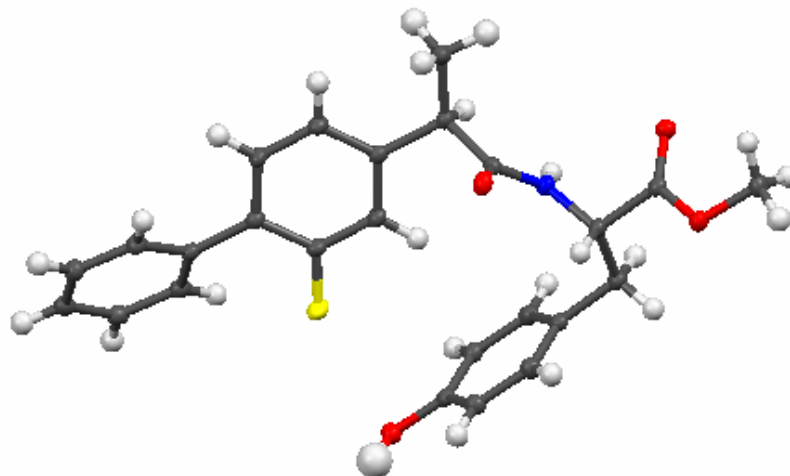
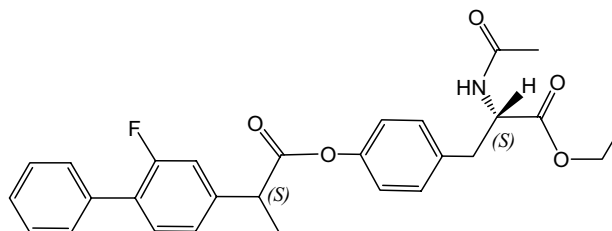


Figura 4.32. Estructura de rayos X de la diada (R,S)-3 (Referencia CCDC 662961).

2-(S)-[2-fluoro-(1,1'-bifenil)-4-il] propanoato de (S)-4-(2-acetamida-2-etoxicarboniletil)fenilo, (S,S)-4.



Rendimiento: 89%.

Purificación: cromatografía preparativa (DCM/Acetato de etilo).

Estado físico: cristalino.

Temperatura de fusión: 89-92 °C.

Espectro de absorción UV λ_{\max} (log ϵ): 246 (4.3), 276 (3.7).

Espectro de IRTF ν ; 3290, 3060, 3035, 2981, 2935, 1751, 1657, 1508, 1375, 1200, 1167, 1132, 768, 698.

Espectro de masas m/z (%): 79.2 (10%), 107.2 (41%), 136.3 (6%), 178.2 (16%), 197.9 (19%), 199.2 (83%), 226.3 (100%).

Espectro de RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 7.56-7.18 (m, 8H), 7.12-6.94 (AA'BB', 4H), 6.35 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 4.85-4.79 (m, 1H), 4.12 (q, 2H, J = 7.2 Hz), 3.97 (q, 1H, J = 7.2 Hz), 3.10 (dd, 1H, J_1 = 14.0 Hz, J_2 = 6.1 Hz), 3.02 (dd, 1H, J_1 = 14.0 Hz, J_2 = 6.0 Hz), 1.93 (s, 3H), 1.62 (d, 3H, J = 7.2 Hz), 1.20 (t, 3H, J = 7.2 Hz).

Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 172.7, 171.9, 170.1, 161.7, 158.4, 150.1, 141.6, 135.7, 134.1, 131.3, 130.5, 129.2, 128.8, 128.1, 123.9, 121.6, 115.7, 115.4, 61.8, 53.5, 45.4, 37.5, 23.2, 18.6, 14.4.

Análisis elemental: para C₂₈H₂₈FNO₅.

Calculado: C 70.43; H 5.91; N 2.93.

Experimental: C 70.31; H 6.16; N 2.94.

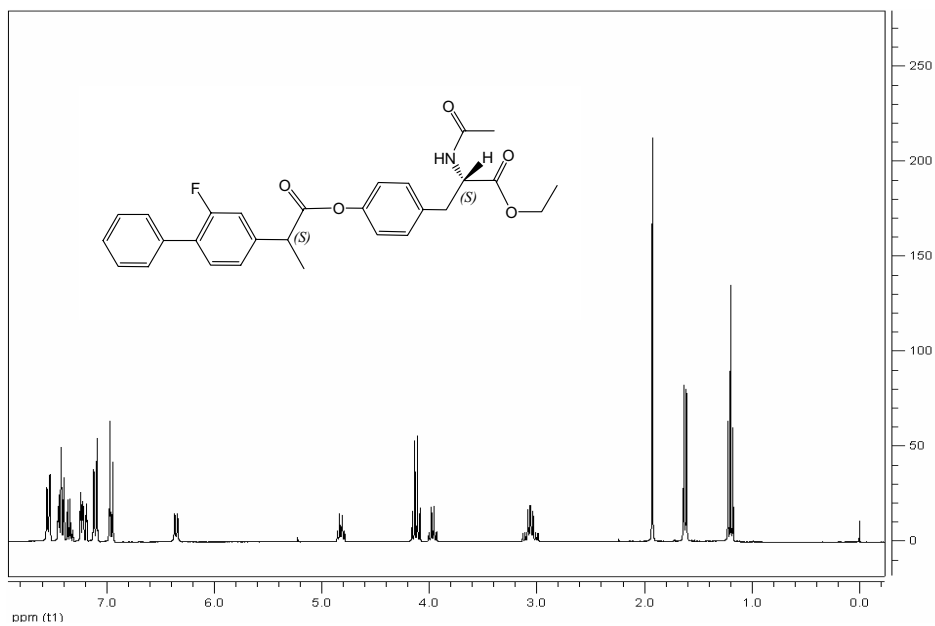


Figura 4.33. RMN-¹H de la diada (S,S)-4, CDCl₃.

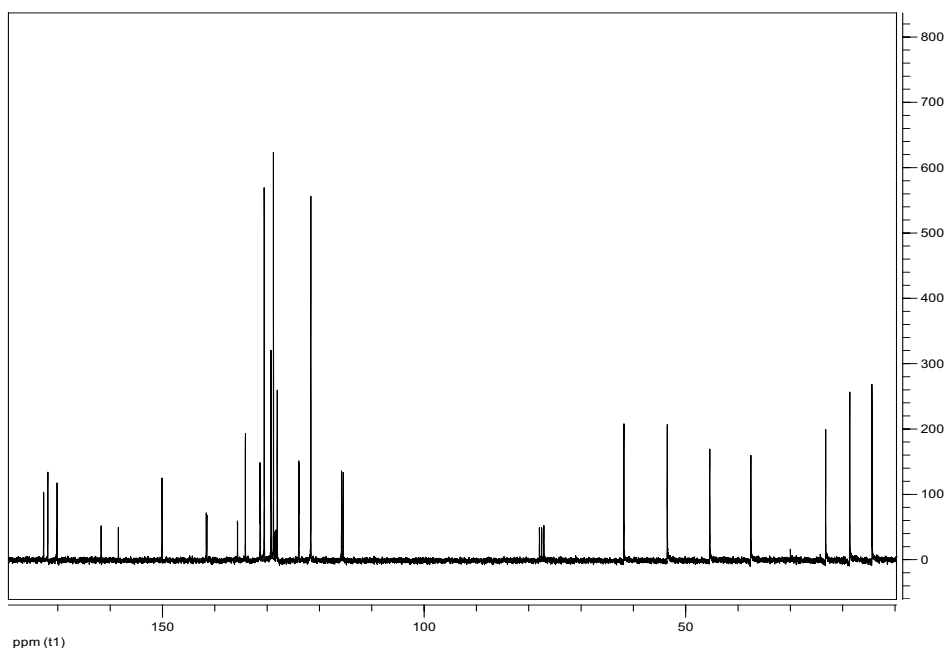
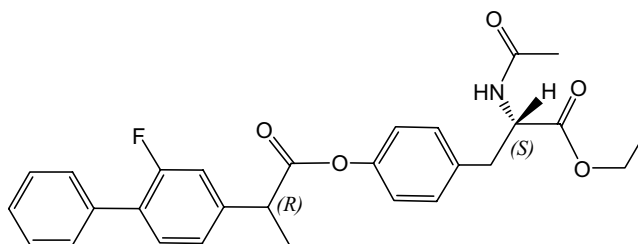


Figura 4.34. RMN-¹³C de la diada (S,S)-4, CDCl₃.

2-(R)-[2-fluoro-(1,1'-bifenil)-4-il] propanoato de (S)-4-(2-acetamida-2-etoxicarboniletil)fenilo, (R,S)-4.



Rendimiento: 90 %.

Purificación: cromatografía preparativa (DCM/Acetato de etilo).

Estado físico: cristalino.

Temperatura de fusión: 88-92 °C.

Espectro de absorción UV λ_{\max} (log ϵ): 246 (4.3), 276 (3.7).

Espectro de FTIR ν ; 3315, 3082, 3036, 2985, 2939, 1749, 1649, 1546, 1506, 1419, 1227, 1167, 766, 696.

Espectro de masas m/z (%): 79.2 (8%), 107.2 (43%), 136.3 (8%), 178.2 (16%), 197.9 (19%), 199.2 (88%), 226.3 (100%).

Espectro de RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 7.56-7.18 (m, 8H), 7.11-6.95 (AA'BB', 4H), 6.13 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 4.86-3.80 (m, 1H), 4.14 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 3.97 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz), 3.12 (dd, 1H, $J_1 = 14.0$ Hz, $J_2 = 6.0$ Hz), 3.06 (dd, 1H, $J_1 = 14.0$ Hz, $J_2 = 6.0$ Hz), 1.95 (s, 3H), 1.64 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz), 1.22 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz).

Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 172.7, 171.8, 170.0, 161.7, 158.4, 150.1, 141.6, 135.6, 134.0, 131.3, 130.5, 129.2, 128.8, 128.5, 128.3, 128.0, 123.9, 121.6, 115.7, 115.4, 61.9, 53.4, 45.4, 37.5, 23.3, 18.6, 14.4.

Análisis elemental: para C₂₈H₂₈FNO₅.

Calculado: C 70.43; H 5.91; N 2.93.

Experimental: C 70.50; H 6.03; N 2.94.

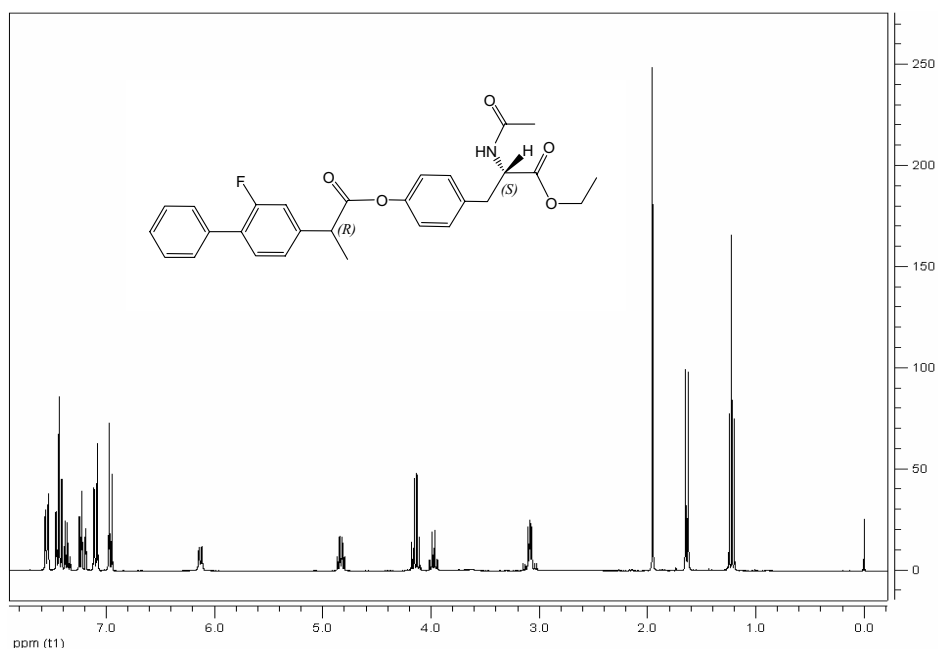


Figura 4.35. RMN-¹H de la diada (R,S)-4, CDCl₃.

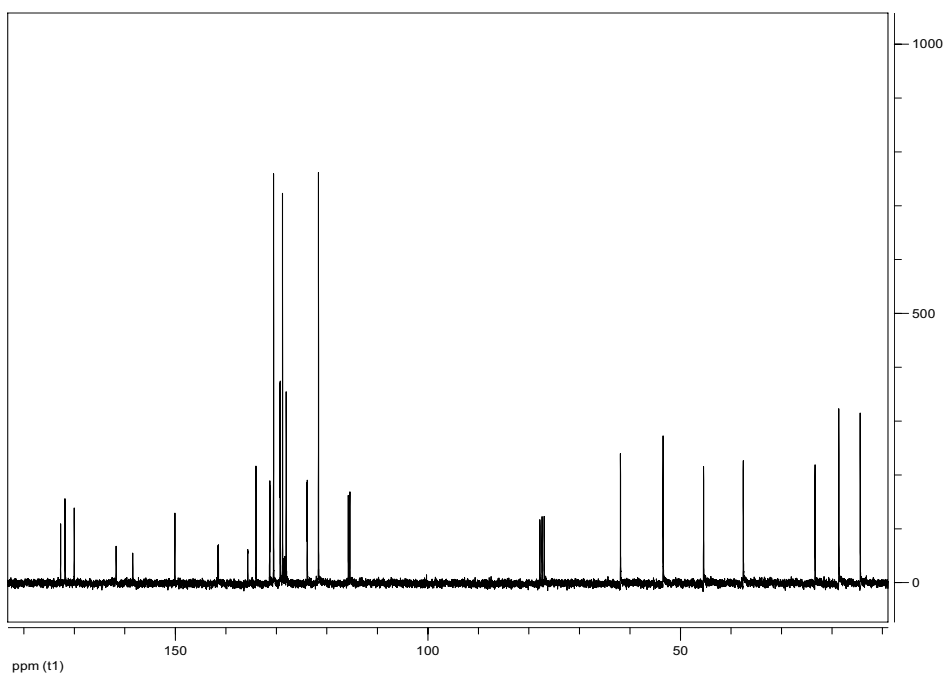


Figura 4.36. RMN-¹³C de la diada (R,S)-4, CDCl₃.

4.5. Referencias bibliográficas

1. Peters, T. *All About Albumin; Biochemistry, Genetics and Medical Applications*, Academic Press, **1995**.
2. He, K. M., D. C. Carter. *Nature*. **1992**; 358: 209.
3. Dockal, M., Carter, D. C., Rücker, F. *J. Biol. Chem.* **1999**; 274: 29303.
4. Sugio, S. Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., Kobayashi, K. *Prot. Eng.* **1999**; 12: 439.
5. Kragh-Hansen, U, Chuang, V. T. G., Otagiri, M. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**; 25: 695.
6. Sudlow, G., Birkett, D. J, Wade, D. N. *Mol. Pharmacol.* **1976**; 12: 1052.
7. Sudlow, G., Birkett, D. J, Wade, D. N. *Mol. Pharmacol.* **1975**; 11: 824.
8. Fehske, K. J., Müller, W. E., Schläfer, U. *Prog. Drug. Protein Binding.* **1981**; 5: 15.
9. Chuang, V. T. G., Otagiri, M. *Chirality*. **2006**; 18: 159.
10. Lewis, A. J., Furst, D. E. *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Mechanisms and Clinical Uses*, 2nd ed.; Marcel Dekker, New York, **1994**.
11. Evans, A. M. *J. Clin. Pharmacol.* **1996**; 36: 7S.
12. Rahman, M. H., Yamasaki, K., Shin, Y. H., Lin, C. C., Otagiri, M. *Biol. Pharm. Bull.* **1993**; 16: 1169.
13. Lackowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd ed.; Plenum Press: New York, **1999**; Chapter 16.
14. Longworth, J. W. Intrinsic fluorescence of proteins in *Time Resolved Fluorescence Spectroscopy in Biochemistry and Biology* R. B. Cundall and R. E. Dale eds; Plenum Press: New York, **1983**.
15. Jiménez, M. C., Miranda, M. A., Tormos, R., Vayá, I. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**; 3: 1038.

16. Murov, S. L., Carmichael, I., Hug, G. L. *Handbook of Photochemistry*, 2nd ed.; Marcel Dekker: New York, **1993**.
17. Weller, A. Z. *Phys. Chem.* **1982**; 133: 93.
18. *Handbook of Chemistry and Physics*, 85th ed.; CRC Press: Boca Raton, **2004**.

CAPÍTULO 5. Estudio de las interacciones FBPMe/AS

5.1. Introducción

Las propiedades y funciones principales de las albúminas séricas han sido descritas en el capítulo de *introducción*, sin embargo, se van a recordar algunos aspectos generales.

Las albúminas séricas humana y bovina han servido como modelos de proteínas para diversos estudios, entre los que se incluye la interacción de sustratos de distinta naturaleza con estas proteínas,¹⁻⁷ entre los que se encuentran los fármacos.⁸⁻¹⁷

Como ya se comentó, los AINES se unen preferentemente, y en algunos casos de forma esterosselectiva, al sitio II de ASH.¹⁸ Sin embargo, si el grupo carboxílico del fármaco se metila, éste muestra preferencia por el sitio I de ASH.¹⁹ En la Figura 5.1 se muestra de forma esquemática la interacción preferente del fármaco flurbiprofeno (FBP) y de su éster metílico (FBPMe) en el sitio II y sitio I en ASH, respectivamente.

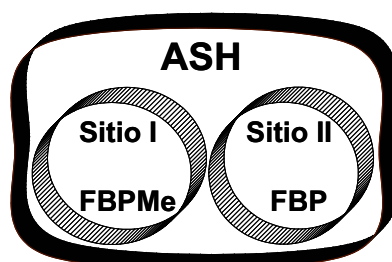


Figura 5.1. Interacción preferente del flurbiprofeno y su éster metílico en el sitio II y sitio I de unión en la albúmina sérica humana.

El objetivo propuesto consiste en utilizar el estado excitado triplete del FBP como sonda para obtener información sobre las interacciones que existen con ASH y ASB. Las propiedades de estos

estados son sensibles al medio en el que se encuentran.²⁰ Así pues, el estudio de los estados excitados triplete podría proporcionar información sobre la distribución del fármaco en los distintos sitios de unión de la albúmina sérica o libre en disolución. Además, el tiempo de vida del estado excitado triplete podría dar información sobre la naturaleza del complejo fármaco/ASH, así como sobre la fuerza de enlace, la existencia de restricciones conformacionales, requerimientos estereoquímicos, protección frente al ataque de O₂ y otros reactivos, etc. Existen trabajos recientes donde se hace uso de la técnica de FDL para estudiar las interacciones entre carprofeno (AINE de la familia de los ácidos 2-arilpropiónicos) y ASH.⁶ Sin embargo, en este caso existió una rápida reacción entre el estado excitado triplete del fármaco y el residuo de aminoácido Trp del sitio I de la albúmina, lo cual limita sus posibilidades para poder ser usado como sonda. Para evitar esto, se podría utilizar un fármaco cuyo estado excitado triplete fuese “inerte”, es decir, que no interaccionase rápidamente con la proteína y cuyo rendimiento cuántico de formación de fotoproductos por absorción de luz fuese lo más bajo posible. El flurbiprofeno es buen candidato para realizar este tipo de estudios. Sus propiedades fotofísicas y fotoquímicas han sido caracterizadas²¹ (Capítulo 3). Se conoce la energía y el tiempo de vida del estado excitado triplete de menor energía del FBP.

En primer lugar se van a estudiar las interacciones entre el éster metílico del flurbiprofeno (FBPMe)²² y ASH y ASB. El motivo por el cual se escogió el FBPMe viene dado por su mayor carácter hidrofóbico, que favorecerá la inclusión de éste en el interior de AS (preferentemente en el sitio I). El estudio se realizó con las formas enantioméricas (*S*)- y (*R*)-FBPMe con el fin de detectar la existencia de una posible estereodiferenciación en la interacción del FBPMe con AS.

5.2. Resultados y discusión

5.2.1. Caracterización de FBPMe

Antes de pasar al estudio de los sistemas FBPMe en presencia de proteína, se realizó una breve caracterización fotofísica del fármaco metilado,²² cuyas propiedades son ligeramente distintas de las del FBP, caracterizado en el *Capítulo 3*.

El espectro UV-vis del FBPMe es el mismo que el del FBP (Figura 3.2, página 60), presentando un máximo de absorción a 246 nm y un hombro a 274 nm.

En fluorescencia, muestra un máximo de emisión centrado alrededor de los 310 nm. En la Tabla 5.1 se muestran los valores de rendimientos cuánticos (ϕ_F), tiempos de vida (τ_F) y constantes de fluorescencia (k_F) en distintos disolventes y en atmósfera de aire y N_2 . Se observa que la fluorescencia del FBPMe es sensible a la presencia de oxígeno, ya que en atmósfera de aire disminuye ϕ_F y τ_F .

Disolvente	ϕ_F		τ_F/ns^a		k_F/s^{-1}
	Aire	N_2	Aire	N_2	N_2
MeCN	0.21	0.24	1.8	2.1	1.1×10^8
Hexano	0.26	0.29	1.7	2.2	1.3×10^8
PBS	0.17	0.20	0.9	1.2	1.7×10^8

Tabla 5.1. Propiedades fotofísicas derivadas del primer estado excitado singlete del FBPMe en disolución y en atmósfera de aire y N_2 . Medidas obtenidas excitando a 266 nm. ^a τ_F se midió fijando λ_{em} a 310 nm.

En cuanto a las medidas de FDL ($\lambda_{ex} = 266$ nm), el FBPMe también muestra un máximo de absorción triplete-triplete centrado a 360

nm, el cual se desactiva por la presencia de O₂ con una constante $k_D(\text{O}_2) = 1.2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Se determinó τ_T en atmósfera de N₂ y aire en disolventes de distinta polaridad (Tabla 5.2).

	MeCN	Hexano	PBS
<i>N₂</i>	29.1	11.3	87.4
<i>Aire</i>	0.5	0.7	1.5

Tabla 5.2. Tiempos de vida (μs) del primer estado excitado triplete del FBPMe en atmósfera de N₂ y aire ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$).

5.2.2. Sistemas FBPMe/ASH

En primer lugar se realizó el estudio de FDL del (S)- y (R)-FBPMe en presencia de ASH.

En el caso del isómero (S)-, se prepararon una serie de disoluciones acuosas en tampón fosfato (PBS 0.01 M, pH = 7.4) conteniendo (S)-FBPMe y ASH en un intervalo de relación de concentraciones (S)-FBPMe/ASH comprendido entre 10:1 y 0.5:1. La concentración de (S)-FBPMe se mantuvo en todo momento constante (2.5×10^{-5} M), variando la de ASH. Estas disoluciones se sometieron a FDL ($\lambda_{\text{ex}} = 266$ nm). Se siguió este procedimiento experimental con el propósito de obtener una señal de absorbancia de triplete del (S)-FBPMe reproducible, con el fin de minimizar los errores en el posterior análisis de regresión de la cinética de desaparición de la señal obtenida.

En ausencia de ASH, el espectro de absorción de la especie transitoria generada tras excitación de una disolución de (S)-FBPMe (2.5×10^{-5} M) en atmósfera de aire mostró un máximo a 360 nm, correspondiente al primer estado excitado triplete del FBPMe. La desactivación de este estado excitado ($\lambda_{\text{máx}} = 360$ nm) siguió una ley exponencial de primer orden, cuyo tiempo de vida fue de 1.5 μs . La Figura 5.2 muestra la desactivación del estado excitado triplete del (S)-FBPMe en disolución (en ausencia de ASH) y en presencia de ASH a distintas relaciones molares (S)-FBPMe/ASH.

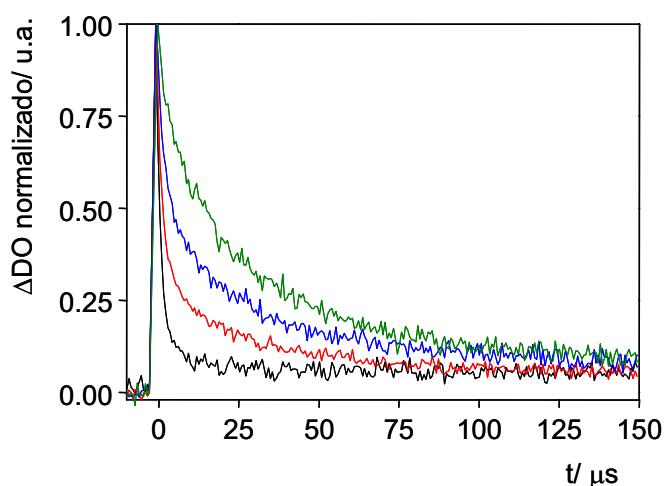


Figura 5.2. Cinéticas de desactivación normalizadas ($\lambda_{m\acute{a}x} = 360$ nm) del (S)-FBPMe (negro) y de las mezclas (S)-FBPMe/ASH 5:1 (rojo), 2.5:1 (azul) y 1:1 (verde), tras FDL ($\lambda_{ex} = 266$ nm) en disolución de PBS en atmósfera de aire. La concentración de (S)-FBPMe se mantuvo constante en todos los casos (2.5×10^{-5} M).

Como se puede apreciar en la Figura 5.2, en presencia de ASH el triplete del (S)-FBPMe mostró un tiempo de vida mucho mayor que en ausencia de albúmina. Además, la cinética de desactivación no fue de tipo monoexponencial sino multiexponencial. Así, cuando la relación de concentraciones (S)-FBPMe/ASH se encontró en el rango comprendido entre 1:1 y 0.5:1, la desactivación del (S)-FBPMe siguió una ley exponencial de segundo orden, con valores de tiempos de vida de 4.1 y 31.5 μs . La ausencia de la componente de 1.5 μs indicó que no existía (S)-FBPMe libre en disolución en estas condiciones.

Es de destacar el notable aumento en los tiempos de vida de triplete del (S)-FBPMe en presencia de ASH, que se vieron incrementados hasta 21 veces con respecto al tiempo de vida de triplete del (S)-FBPMe libre en disolución. Este hecho puede ser explicado por la menor desactivación radiante del 3 FBPMe debido a importantes restricciones en los grados de libertad en los sitios de unión de ASH. En

estos microambientes, el entorno que rodea al (S)-FBPMe puede proteger su estado excitado triplete frente al ataque de diversos reactivos, como puede ser una segunda molécula de (S)-FBPMe, oxígeno u otros reactivos. En este sentido, el hecho de obtener dos valores de tiempos de vida de triplete distintos cuando el (S)-FBPMe está unido a la albúmina (a una relación de concentración entre 1:1 y 0.5:1) se correlaciona bien con la existencia de los dos sitios de unión en ASH (sitio I y sitio II).

Con el propósito de conocer la correspondencia de los tiempos de vida de triplete del (S)-FBPMe (4.1 y 31.5 μs) en el sitio I o sitio II de ASH, se determinó la ocupación de estos por análisis de regresión de las curvas de desactivación de triplete ($\lambda_{\text{máx}} = 360 \text{ nm}$) de la mezcla (S)-FBPMe/ASH a la relación de concentración 1:1 (donde no se observa la componente de 1.5 μs correspondiente al (S)-FBPMe libre en disolución). Esto permitió conocer los valores de A correspondientes a las dos componentes de diferentes tiempos de vida, las cuales se asocian a la cantidad de FBPMe unido al sitio I o sitio II de ASH. Basándonos en el hecho de que el sitio de mayor afinidad por el FBPMe es el sitio I de la albúmina,²³ el coeficiente A de mayor valor, en estas condiciones de no saturación de ASH por FBPMe, se asignó al FBPMe unido al sitio I de ASH. Este, además, correspondió con el de mayor tiempo de vida de triplete (31.5 μs). Sin embargo, el coeficiente A de menor valor se asignó al FBPMe unido al sitio II de menor afinidad de ASH, el cual correspondió con el valor tiempo de vida menor (4.1 μs).

Cuando la relación de concentraciones (S)-FBPMe/ASH fue mayor (entre 1.25:1 y 10:1), fueron necesarios tres valores de tiempos de vida (1.5, 4.1 y 31.5 μs) para obtener un buen ajuste de la desactivación del triplete. Este hecho se asoció con la existencia de

(S)-FBPMe libre en disolución junto con la cantidad de (S)-FBPMe unido en ambos sitios de unión de ASH en estas condiciones.

Un estudio similar se llevó a cabo con el (*R*)-FBPMe. En disolución de PBS, el espectro de absorción de la especie transitoria generada y el tiempo de vida de triplete no difería del obtenido para el caso del enantiómero (*S*)-. La Figura 5.3 muestra la desactivación del estado excitado triplete del (*R*)-FBPMe cuando se encuentra libre en disolución y cuando está en presencia de ASH a distintas proporciones (*R*)-FBPMe/ASH.

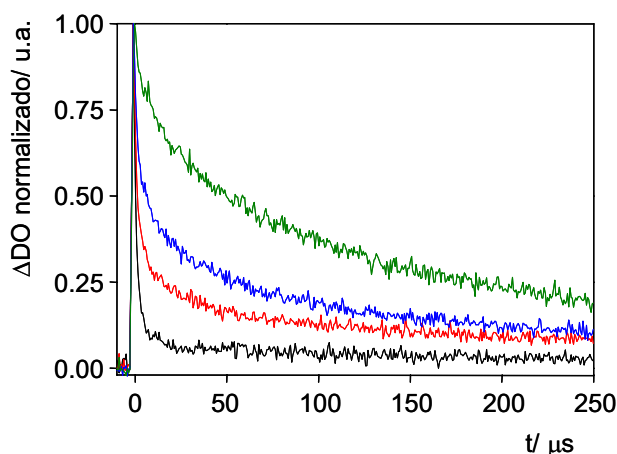


Figura 5.3. Cinéticas de desactivación normalizadas ($\lambda_{\text{máx}} = 360 \text{ nm}$) del (*R*)-FBPMe (negro) y de las mezclas (*R*)-FBPMe/ASH 5:1 (rojo), 2.5:1 (azul) y 1:1 (verde), tras FDL ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) en disolución de PBS en atmósfera de aire. La concentración de (*R*)-FBPMe se mantuvo constante en todos los casos ($2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$).

Cuando el (*R*)-FBPMe se encontró en presencia de ASH, las dos componentes obtenidas del tiempo de vida de triplete fueron 16.6 y 157.6 μs , mucho mayores que en el caso del (*S*)-FBPMe (4.1 y 31.5 μs , respectivamente). Por tanto, existe una importante estereodiferenciación en la interacción de los enantiómeros con la proteína. La Figura 5.4 muestra una comparativa de las cinéticas de desactivación del estado

excitado triplete del (S)-FBPMe ($\lambda_{\text{máx}} = 360$ nm) y de las mezclas (S)-FBPMe/ASH y (R)-FBPMe/ASH a una relación de concentración 1:1 tras ser sometidas a fotólisis de destello láser ($\lambda_{\text{ex}} = 266$ nm) en atmósfera de aire.

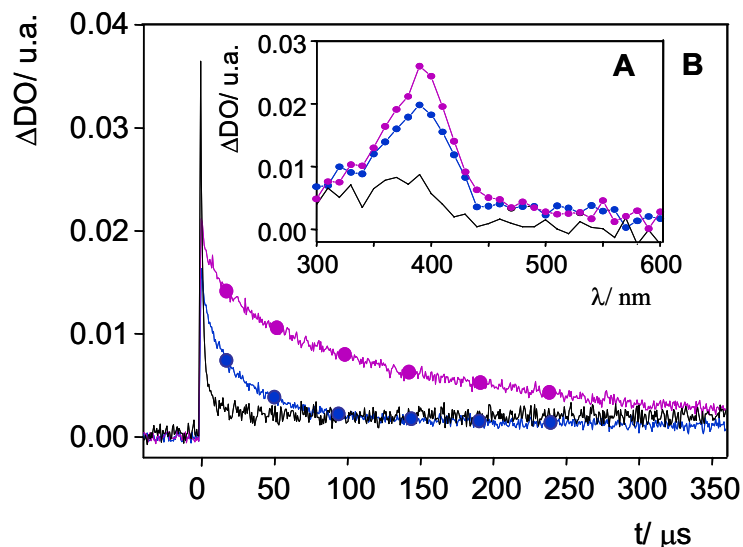


Figura 5.4. Fotólisis de destello láser ($\lambda_{\text{ex}} = 266$ nm) de disoluciones 2.5×10^{-5} M del (S)- o (R)-FBPMe (negro) y de mezclas (S)-FBPMe/ASH (azul) y (R)-FBPMe/ASH (magenta) a relación de concentraciones 1:1 en disolución 0.01 M PBS y atmósfera de aire. **A)** Espectro obtenido $3.7 \mu\text{s}$ después del pulso de láser. **B)** Cinéticas de desactivación monitorizadas a 360 nm.

Para conocer la correspondencia de los dos tiempos de vida de triplete del (R)-FBPMe (16.6 y $157.6 \mu\text{s}$) en los sitios I y II de unión de ASH, de nuevo se realizó un análisis de regresión de las cinéticas de desactivación de la mezcla (R)-FBPMe/ASH a la relación de concentración 1:1. De esta forma se asignó la componente mayoritaria (que además fue la de mayor tiempo de vida, $157.6 \mu\text{s}$) a la interacción del (R)-FBPMe en el sitio I de unión de mayor afinidad de ASH, mientras

que la componente minoritaria (y de menor tiempo de vida, 16.6 μ s) se asignó a la interacción de (*R*)-FBPMe en el sitio II (de menor afinidad) de ASH. La Tabla 5.3 muestra los tiempos de vida de ambos enantiómeros en el sitio I y sitio II de unión de ASH.

	<i>libre</i>	<i>Sitio I</i>	<i>Sitio II</i>
(<i>S</i>)-FBPMe/ASH	1.5	31.5	4.1
(<i>R</i>)-FBPMe/ASH		157.6	16.6

Tabla 5.3. Tiempos de vida (μ s) del estado excitado triplete del FBPMe libre en disolución y unido al sitio I o sitio II de unión de ASH.

Con el fin de obtener una evidencia independiente para confirmar la asignación de los sitios de unión de (*S*)- y (*R*)-FBPMe en ASH, se llevaron a cabo experimentos adicionales de FDL en presencia de warfarina, un ligando específico del sitio I de unión de la albúmina sérica humana.²⁴ La adición de warfarina sobre una mezcla FBPMe/ASH dio como resultado una disminución de la contribución correspondiente a la componente de mayor tiempo de vida de triplete, (FBPMe en el sitio I). Así pues, a una relación de concentraciones FBPMe/ASH/warfarina 1:1:1 la contribución de la componente de mayor tiempo de vida se redujo a un 50%, mientras que el valor de esta contribución, en ausencia de warfarina, era del 70%. Por tanto, la warfarina desplazó una fracción del FBPMe del sitio I, sacando parte de éste de la proteína (quedando libre en disolución), y desplazándolo, en un porcentaje menor, al sitio II de menor afinidad.

Una vez se confirmó la correcta asignación de los sitios de unión con los tiempos de vida obtenidos, se procedió a determinar la ocupación de los sitios de unión I y II en ASH y la proporción de FBPMe libre en disolución de mezclas (S)- o (R)-FBPMe/ASH a distintas relaciones de concentración (de 10:1 a 0.5:1). Para ello, se fijaron los tiempos de vida obtenidos anteriormente para cada uno de los enantiómeros (Tabla 5.3). De esta forma, la realización del ajuste multiexponencial de la desactivación, para cada una de las distintas proporciones de concentración, permitió obtener los valores de A correspondientes a la cantidad de FBPMe libre en disolución y unido al sitio I y sitio II de ASH para cada uno de los enantiómeros. Se observó que a una relación de concentración inferior a 1.3:1, no quedaba FBPMe libre en disolución. La distribución de (S)- y (R)-FBPMe libre y unido a los sitios I y II de ASH se muestra en la Figura 5.5.

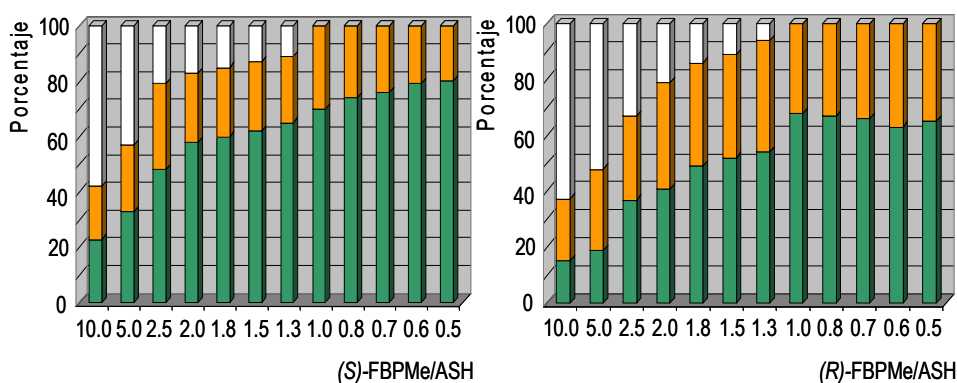


Figura 5.5. Porcentaje de FBPMe: libre (blanco), unido al sitio I (verde) y unido al sitio II (naranja) de ASH; (S)-FBPMe (izquierda) y (R)-FBPMe (derecha).

La Figura 5.6 muestra una comparativa sobre la proporción de (S)- y (R)-FBPMe libre en disolución y unido al sitio I y sitio II de ASH.

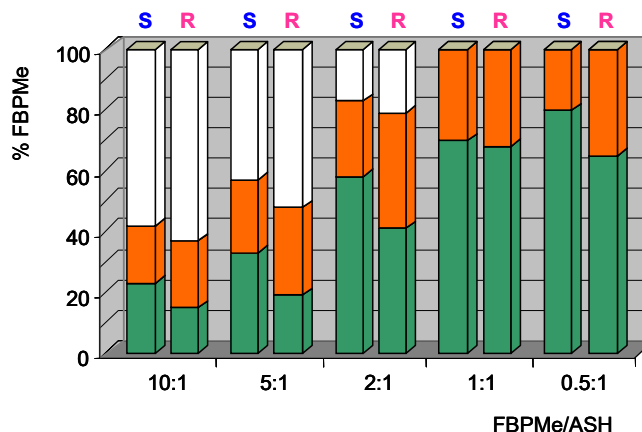


Figura 5.6. Porcentaje de (S)-FBPMe y (R)-FBPMe: libre en disolución (blanco), unido al sitio I (verde) y sitio II (naranja) de unión de ASH.

Como se puede apreciar, para las mismas relaciones de concentración FBPMe/ASH, la interacción con la albúmina sérica humana está ligeramente favorecida para el enantiómero (S)-. Además, existe una interacción estereoselectiva al comparar los niveles de ocupación de ambos sitios de unión, ya que se observa una mayor preferencia por el sitio I (de mayor afinidad) en el caso del (S)-FBPMe. En general, cuando las relaciones de concentración FBPMe/ASH fueron bajas (lejos de saturación de ASH), el total de FBPMe permanecía unido a la proteína, observándose una ligera estereoselectividad en la interacción del FBPMe en el sitio I, favorecida para el isómero (S)-. Sin embargo, al aumentar la relación de concentraciones FBPMe/ASH, se produjo la saturación del sitio I y sitio II de la albúmina, lo cual dio lugar a una disminución en la población selectiva de los sitios de unión.

(Figura 5.7) y un incremento de la concentración de FBPMe libre en disolución.

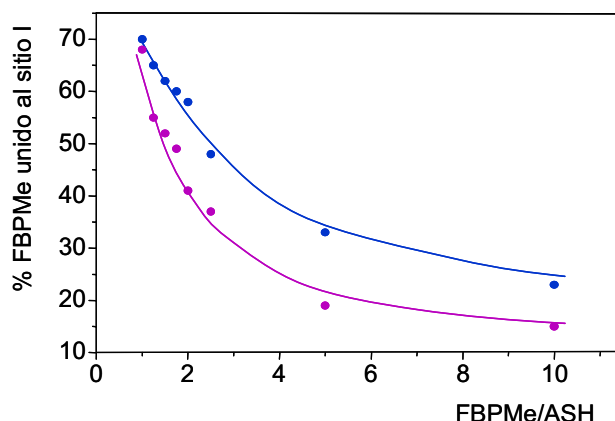


Figura 5.7. Porcentaje de (R)-FBPMe (magenta) y (S)-FBPMe (azul) unido al sitio I de unión de ASH a distintas relaciones de concentración FBPMe/ASH.

Como experimento control, con el propósito de asegurar que la estereodiferenciación observada en la interacción de ambos enantiómeros con ASH era real y no consecuencia de la presencia de alguna impureza o algún posible error experimental, se estudió el comportamiento de la muestra racémica del FBPMe ((*Rac*)-FBPMe) en presencia de ASH, para ser comparada con el comportamiento de los enantiómeros puros. Como era de esperar, la cinética de desactivación obtenida a 360 nm para una mezcla (*Rac*)-FBP/ASH, a una relación de concentraciones 1:1, correspondió con la semisuma de las cinéticas de desactivación de los enantiómeros (S)- y (R)-FBPMe en ASH bajo las mismas condiciones (Figura 5.8).

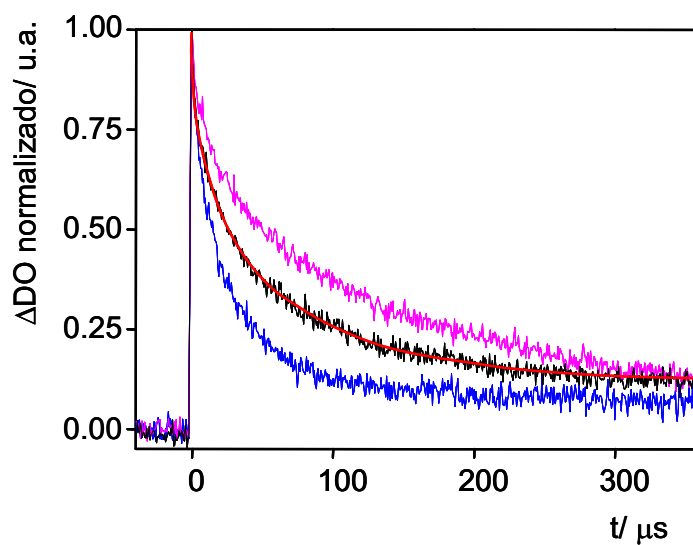


Figura 5.8. Cinética de desactivación ($\lambda_{m\acute{a}x} = 360$ nm) obtenida tras fotólisis de destello láser ($\lambda_{ex} = 266$ nm) de (S)-FBPMe/ASH 1:1 (azul), (Rac)-FBPMe/ASH 1:1 (negro) y (R)-FBPMe/ASH 1:1 (magenta), a concentración 2.5×10^{-5} M de FBPMe. La línea roja corresponde a la semisuma de las cinéticas de desactivación de los enantiómeros (S)- y (R)-FBPMe en ASH.

5.2.3. Sistemas FBPMe/ASB

Con el fin de investigar el comportamiento de (S)- y (R)-FBPMe en ASB, se llevaron a cabo experimentos similares a los ya efectuados para el caso de ASH. De forma análoga, se prepararon una serie de disoluciones acuosas en tampón fosfato (PBS 0.01 M, pH = 7.4) conteniendo (S)- o (R)-FBPMe y ASB, en un intervalo de relación de concentraciones FBPMe/ASB comprendido entre 10:1 y 0.5:1. La concentración de FBPMe se mantuvo en todo momento constante (2.5×10^{-5} M), variándose, así, la de ASB. Posteriormente, todas estas disoluciones se sometieron a FDL ($\lambda_{\text{ex}} = 266$ nm).

En el caso de (S)-FBPMe, a relaciones de concentración (S)-FBPMe/ASB menores de 0.6:1 ($\lambda_{\text{máx}} = 360$ nm), se encontraron dos tiempos de vida de triplete con valores de 4.6 y 19.3 μs . En la Figura 5.9 se muestran distintas cinéticas de desactivación del triplete de (S)-FBPMe en ASB.

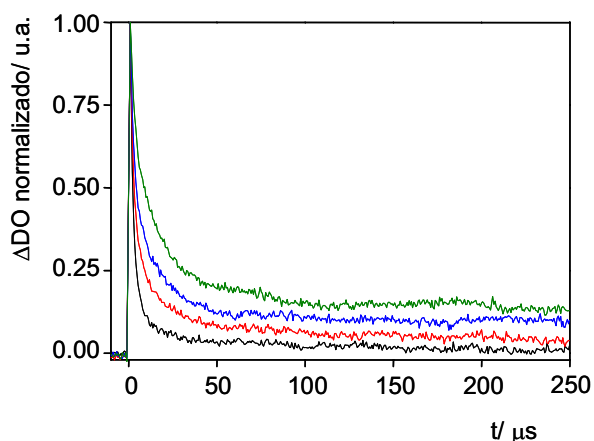


Figura 5.9. Cinéticas de desactivación normalizadas ($\lambda_{\text{máx}} = 360$ nm) del (S)-FBPMe (negro) y de las mezclas (S)-FBPMe/ASB 5:1 (rojo), 2.5:1 (azul) y 1:1 (verde), tras FDL ($\lambda_{\text{ex}} = 266$ nm) en disolución de PBS en atmósfera de aire. La concentración de (S)-FBPMe se mantuvo constante en todos los casos (2.5×10^{-5} M).

El análisis de regresión de las cinéticas de desactivación de las curvas (S)-FBPMe/ASB permitió obtener los valores de los coeficientes A. Cuando la relación de concentración (S)-FBPMe/ASB fue menor de 0.6:1, la componente A de mayor valor encontrada, en condiciones de no saturación de ASB, correspondió con $\tau_T = 19.3 \mu\text{s}$, la cual se asignó al (S)-FBPMe unido en el sitio I de mayor afinidad en ASB, mientras que la componente A de menor valor correspondió a $\tau_T = 4.6 \mu\text{s}$, la cual se asignó al (S)-FBPMe unido al sitio II de menor afinidad de ASB. Estos resultados, de nuevo, indican que el estado excitado triplete del (S)-FBPMe está más protegido frente a la desactivación (bien por ataque de una segunda molécula de (S)-FBPMe, oxígeno u otros reactivos) cuando se encuentra en el microambiente que le proporciona el sitio I de unión de ASB.

Al comparar el tiempo de vida del estado excitado triplete del (S)-FBPMe en el sitio I de ASB con el correspondiente a ASH, este mostró un valor 1.6 veces menor con respecto a la albúmina sérica humana (19.3 vs. 31.5 μs). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los valores correspondientes al sitio II de unión del (S)-FBPMe en ambas albúminas (4.6 vs. 4.1 μs).

Se realizó un estudio similar para el caso del enantiómero (R)- en presencia de ASB. En este caso, los valores de los dos tiempos de vida de triplete ($\lambda_{\text{máx}} = 360 \text{ nm}$) que se obtuvieron tras someter a FDL ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) las disoluciones (R)-FBPMe/ASB, a una relación de concentración menor de 0.6:1, fueron de 2.8 y 19.7 μs . En la Figura 5.10 se muestran las cinéticas de desactivación del estado excitado triplete de distintas mezclas (R)-FBPMe/ASB.

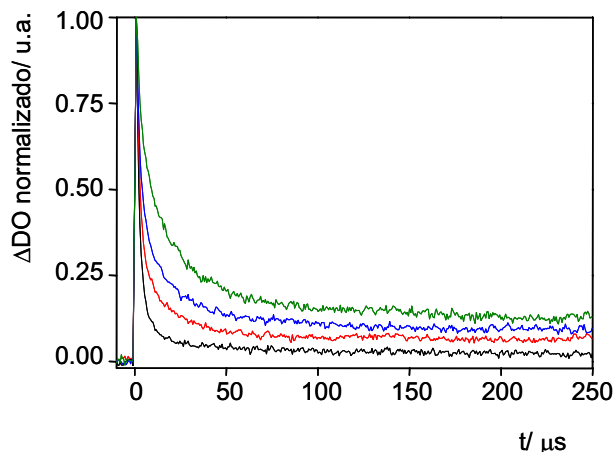


Figura 5.10. Cinéticas de desactivación normalizadas ($\lambda_{\text{máx}} = 360 \text{ nm}$) del (*R*)-FBPMe (negro) y de las mezclas (*R*)-FBPMe/ASB 5:1 (rojo), 2.5:1 (azul) y 1:1 (verde), tras FDL ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) en disolución de PBS en atmósfera de aire. La concentración de (*R*)-FBPMe se mantuvo constante en todos los casos ($2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$).

De nuevo, el análisis de regresión de las cinéticas de desactivación de las curvas (*R*)-FBPMe/ASB (rango de concentraciones menor de 0.6:1), permitió obtener los valores de los coeficientes *A*. Así pues, el valor de $\tau_{\text{T}} = 19.7 \mu\text{s}$ se asignó al (*R*)-FBPMe unido en el sitio I de ASB, mientras que $\tau_{\text{T}} = 2.8 \mu\text{s}$ se asignó al (*R*)-FBPMe unido al sitio II.

La Tabla 5.4 muestra los valores de τ_{T} de (*S*)- y (*R*)-FBPMe en los sitios I y II de unión de ASB.

	<i>libre</i>	<i>Sitio I</i>	<i>Sitio II</i>
(<i>S</i>)-FBPMe/ASB	1.5	19.3	4.6
(<i>R</i>)-FBPMe/ASB		19.7	2.8

Tabla 5.4. Tiempos de vida (μs) del estado excitado triplete del FBPMe libre en disolución y unido al sitio I o sitio II de ASB.

A continuación, se procedió a determinar la ocupación de los sitios de unión I y II en ASB y la proporción de FBPMe libre en disolución a partir de mezclas (S)- o (R)-FBPMe/ASB a distintas relaciones de concentración (de 10:1 a 0.5:1). El procedimiento es el mismo que el seguido para el caso del sistema FBPMe/ASH. Se observó que a una relación de concentración inferior a 0.6:1, no quedaba FBPMe libre en disolución. La distribución de (S)- y (R)-FBPMe libre y en los sitios I y II de unión de ASB (obtenidos a partir de los coeficientes A), se muestra en la Figura 5.11.

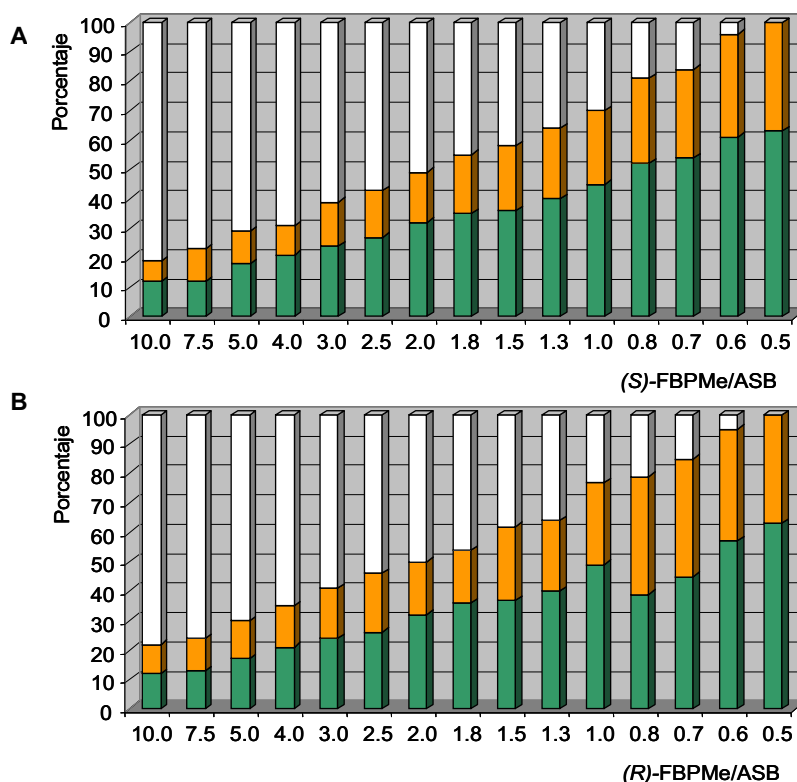


Figura 5.11. Porcentaje de FBPMe: libre (blanco), unido al sitio I (verde) y unido al sitio II (naranja) de ASB; **A)** (S)-FBPMe. **B)** (R)-FBPMe.

En las interacciones FBPMe/ASB, no se observaron diferencias significativas en los tiempos de vida de triplete entre el enantiómero (*S*)- y (*R*)- cuando se encontraban en presencia de proteína. Tampoco se observó estereodiferenciación en la ocupación de los sitios de unión por ambos enantiómeros.

Tras realizar una comparación entre los niveles de ocupación de ambos enantiómeros en ASH y ASB, se observó que las mayores diferencias encontradas en el comportamiento de (*S*)- o (*R*)-FBPMe en ambas proteínas ocurrían a relaciones de concentración FBPMe/AS bajas. Además, se apreció la existencia de una mayor interacción de FBPMe con ASH que con ASB, en las mismas condiciones. Este fenómeno queda reflejado en la Figura 5.12.

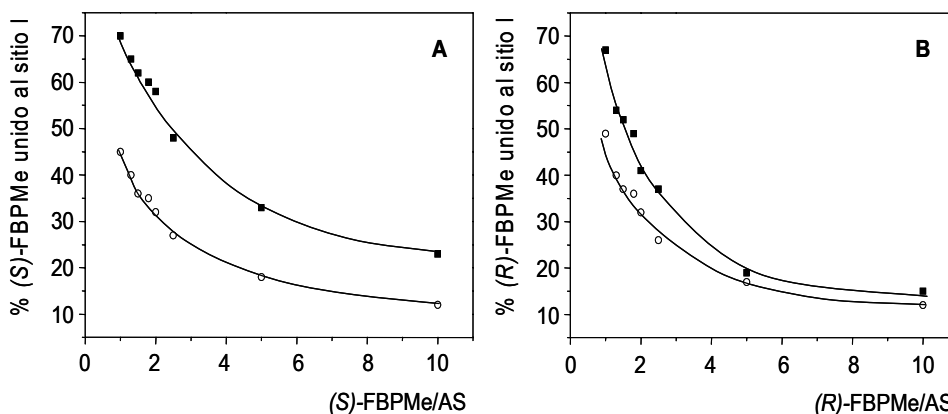


Figura 5.12. A) Porcentaje de (*S*)-FBPMe unido al sitio I en ASH (■) y ASB (○) a distintas relaciones de concentración (*S*)-FBPMe/AS. **B)** Porcentaje de (*R*)-FBPMe unido al sitio I en ASH (■) y ASB (○) a distintas relaciones de concentración (*R*)-FBPMe/AS.

5.2.4. Interacciones competitivas: ASH vs. ASB

Las diferencias más significativas encontradas en la interacción de FBPMe con ASH o ASB se hicieron patentes en condiciones de no saturación de la proteína. Así, a una relación de concentración FBPMe/AS 1:1 no se observó FBPMe libre en disolución en el caso de ASH pero sí para ASB (comparar Figuras 5.5 y 5.11). Se obtuvo un comportamiento similar para los dos enantiómeros del FBPMe.

Por ello, sería posible utilizar el estado excitado triplete del FBPMe para obtener información sobre su distribución en los distintos sitios de unión de diferentes biomoléculas (como las dos albúminas séricas: ASH y ASB).

Se realizó un experimento de FDL donde se añadió (*R*)-FBPMe sobre una mezcla ASH-ASB en disolución tampón de fosfato (PBS 0.01 M, pH = 7.4), a una relación de concentraciones (*R*)-FBPMe/ASH/ASB 1.4:1:1. Es evidente que ésta no es una situación real, pero puede servir de modelo para comprobar la validez de la metodología propuesta.

Cuando la mezcla (*R*)-FBPMe/ASH/ASB (1.4:1:1) se sometió a FDL ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$), se obtuvo el típico espectro debido a la absorción triplete-triplete del FBPMe. Para la realización del análisis de regresión de la desactivación a 360 nm, se asumió que los cuatro tiempos de vida de triplete correspondientes a la interacción de (*R*)-FBPMe en ambos sitios de unión en la mezcla de las dos albúminas séricas eran los mismos que cuando (*R*)-FBPMe interacciona de forma individual con cada una de las albúminas. En la Figura 5.13 se muestran las cinéticas de desactivación del estado excitado triplete del (*R*)-FBPMe en presencia de ASH (relación de concentración 1:1), de una mezcla ASH y ASB (relación de concentración 1.4:1:1) y de ASB (relación de concentración 1:1).

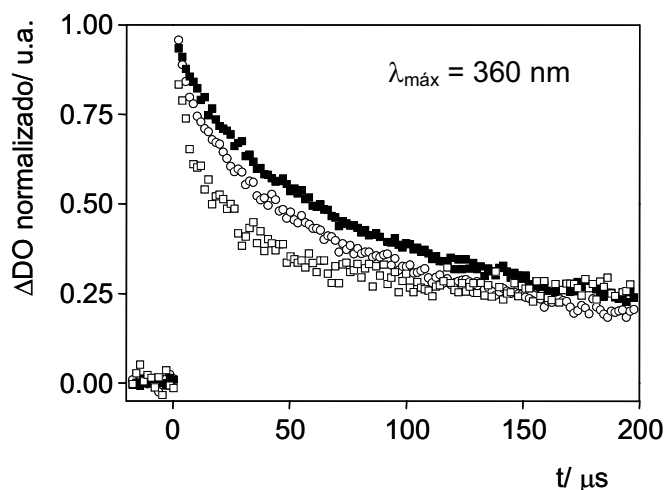


Figura 5.13. Cinéticas de desactivación normalizadas del estado excitado triplete de (R)-FBPMe/ASH 1:1 (■), (R)-FBPMe/ASH/ASB 1.4:1:1 (O) y (R)-FBPMe/ASB 1:1 (□) tras FDL ($\lambda_{ex} = 266$ nm) en atmósfera de aire.

Claramente se observó que el comportamiento de la mezcla (R)-FBPMe/ASH/ASB (1.4:1:1), es intermedio respecto al que daría de forma individual con ASH o ASB; además, existe mayor similitud con el comportamiento mostrado por (R)-FBPMe en presencia de ASH.

Las contribuciones relativas obtenidas experimentalmente de los coeficientes de regresión A en la mezcla (R)-FBPMe/ASH/ASB condujo a los siguientes valores: sitio I de ASH: 55%, sitio II de ASH: 26%, sitio I de ASB: 12%, sitio II de ASB: 7%. Como se puede apreciar, cuando el (R)-FBPMe se encuentra en presencia de una mezcla equimolar de ASH y ASB, interacciona preferentemente con ASH (Figura 5.14).

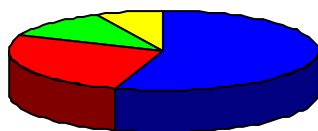


Figura 5.14. Porcentaje de (*R*)-FBPMe unido al sitio I (azul) y sitio II (rojo) de ASH, y sitio I (verde) y sitio II (amarillo) de ASB en una mezcla (*R*)-FBPMe/ASH/ASB 1.4:1:1.

Estos resultados son indicativos de que la metodología propuesta para el estudio de las interacciones fármaco/proteína es válida. Además, se confirmó que la interacción de FBPMe con ASH es mayor que con ASB.

5.3. Conclusiones

- El estado excitado triplete del FBPMe se puede utilizar como sonda para estudiar la interacción en los distintos sitios de unión de la albúmina sérica humana y bovina.

- La población de los sitios I y II de unión de ASH y ASB por FBPMe se puede calcular por análisis de regresión de las cinéticas de desactivación del estado excitado triplete del FBPMe a distintas relaciones de concentración FBPMe/AS.

- En la interacción FBPMe/ASH se observa una importante estereodiferenciación en los tiempos de vida de triplete del FBPMe cuando se encuentra unido a la proteína. Además, existe una interacción estereoselectiva, con preferencia por el sitio I de unión para el enantiómero (*S*)-.

- En la interacción FBPMe/ASB no se observan diferencias significativas ni en los tiempos de vida de triplete de (*S*)- o (*R*)-FBPMe en presencia de proteína ni en la ocupación de ambos sitios de unión.

- Se puede hacer uso de la técnica de FDL para obtener información sobre los niveles de ocupación de un fármaco en una mezcla de dos proteínas.

- El FBPMe interacciona preferentemente con la albúmina sérica humana.

5.4. Parte experimental

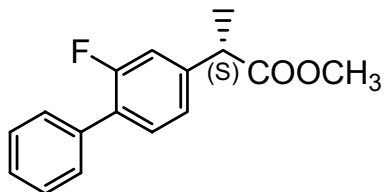
5.4.1. Materiales y disolventes

Las albúminas séricas humana y bovina fueron adquiridas de Sigma. El (S)- y (R)-FBP fueron adquiridos de Aldrich. Las disoluciones de PBS 0.01 M (pH = 7.4) empleadas se obtuvieron por disolución de pastillas tampón fosfato adquiridas de Sigma en agua desionizada Milli-Q. El cloruro de tionilo se obtuvo de Aldrich. El hexano, el metanol y el acetato de etilo se obtuvieron de Scharlau.

5.4.2. Síntesis de (S)- y (R)-FBPM_e

Sobre una disolución de (S)- o (R)-flurbiprofeno en metanol (1 mmol), se añadió cloruro de tionilo (1 mmol), manteniéndose la mezcla de reacción a reflujo durante 1h. El disolvente fue eliminado por destilación a vacío. El aceite resultante se disolvió en diclorometano y se lavó con NaHCO₃ diluido, HCl 1 M y disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se destiló a vacío. El crudo resultante (aceite) se purificó por cromatografía preparativa de gel de sílice usando una mezcla hexano/acetato de etilo 10%. Finalmente, se llevó a cabo una segunda purificación por cristalización, obteniendo un rendimiento del 87%.

2-(S)-(2-Fluoro[1,1'-bifenil]-4-il)-propanoato de metilo, (S)-FBPMe.



Rendimiento: 87%.

Purificación: cromatografía preparativa (DCM).

Estado físico: cristalino.

Punto de fusión: 41.5-42.5 °C.

Rotación óptica: + 49.1°.

Espectro de RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 7.53-7.09 (m, 8H), 3.72 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz), 3.65 (s, 3H), 1.50 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz).

Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 174.2, 161.2, 157.9, 141.8, 135.4, 130.7, 128.8, 128.3, 127.5, 123.4, 115.3, 115.0, 52.0, 44.8, 18.3.

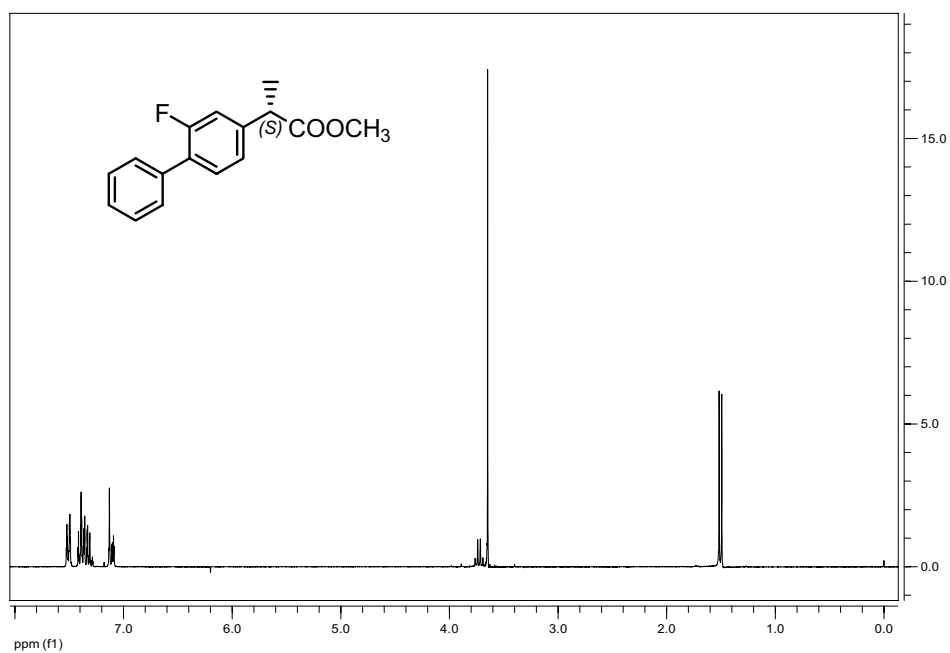


Figura 5.15. RMN-¹H de (S)-FBPMe, CDCl₃.

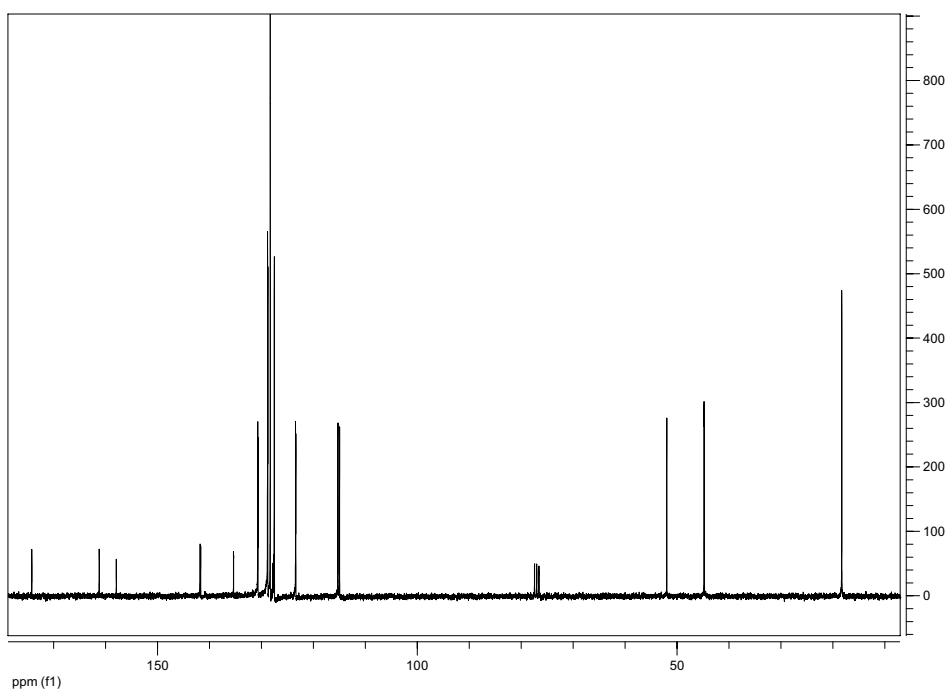
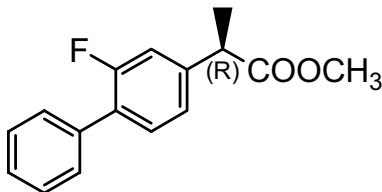


Figura 5.16. RMN-¹³C de (S)-FBPMe, CDCl₃.

2-(R)-(2-Fluoro[1,1'-bifenil]-4-il)-propanoato de metilo, (R)-FBPMe.



Rendimiento: 85%.

Purificación: cromatografía preparativa (DCM).

Estado físico: cristalino.

Punto de fusión: 41.5-42.5 °C.

Rotación óptica: - 49.8°.

Espectro de RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 7.51-7.09 (m, 8H), 3.71 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz), 3.63 (s, 3H), 1.49 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz).

Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 174.1, 161.2, 157.9, 141.8, 135.3, 130.7, 128.8, 128.3, 127.5, 123.4, 115.2, 114.9, 51.9, 44.7, 18.2.

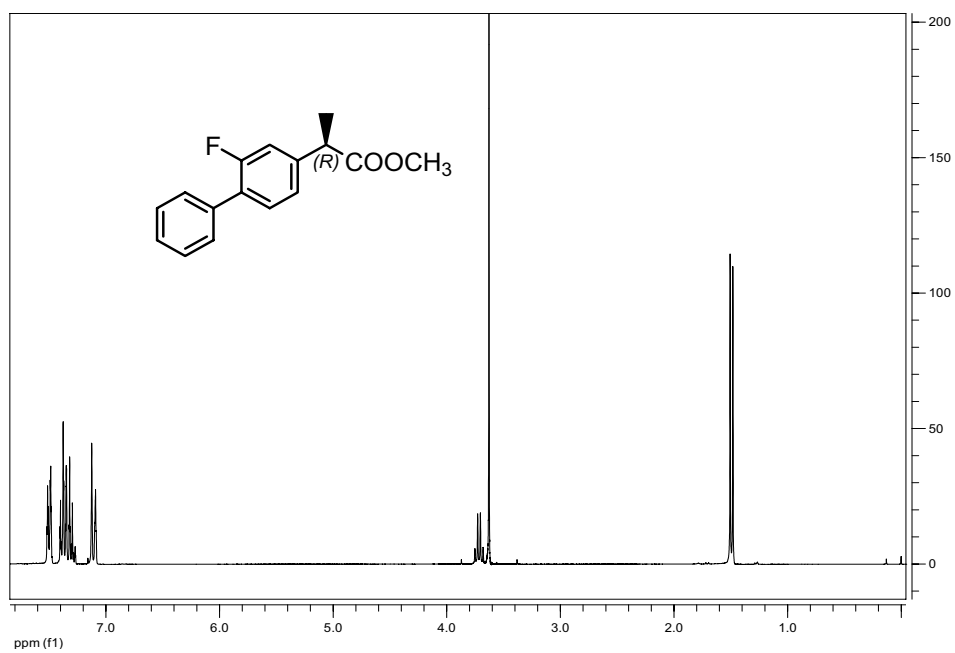


Figura 5.17. RMN- ^1H de (R)-FBPMe, CDCl_3 .

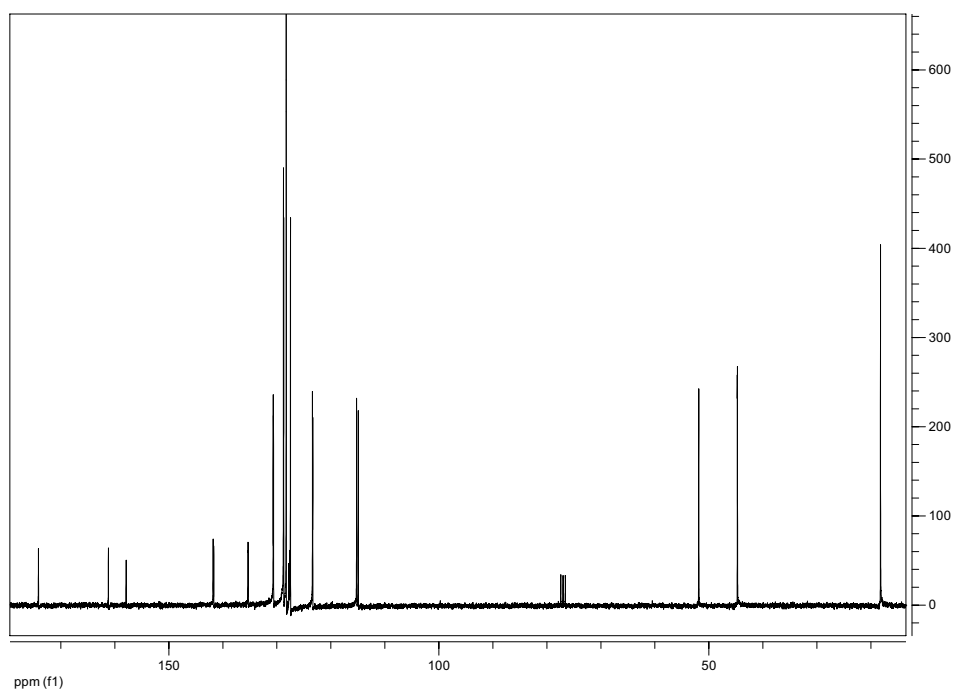


Figura 5.18. RMN- ^{13}C de (R)-FBPMe, CDCl_3 .

5.4.3. General

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono (RMN-¹H y RMN-¹³C) se realizaron usando cloroformo deuterado, con TMS como referencia.

La purificación de los productos se llevó a cabo por cromatografía preparativa de gel de sílice Merck, usando una mezcla hexano/acetato de etilo como eluyente. Posteriormente se llevó a cabo la cristalización del producto en una mezcla diclorometano/hexano.

5.4.4. Experimentos de fotólisis de destello láser

Los experimentos de fotólisis de destello láser se realizaron a una longitud de onda de excitación de 266 nm, (4 mJ por pulso de láser). Las medidas se llevaron a cabo haciendo uso de una cubeta de cuarzo de 10 x 10 mm², con una capacidad de 4 mL.

La absorbancia de las disoluciones de FBPMe se mantuvo aproximadamente a 0.2 a la longitud de onda de excitación del láser, que corresponde a una concentración aproximada de 2.5×10^{-5} M. Los experimentos se realizaron en disolución de PBS (0.01 M, pH = 7.4) a temperatura ambiente (ca. 22 °C) y en atmósfera de aire.

Para los estudios realizados en presencia de albúmina sérica, se prepararon una serie de disoluciones conteniendo (S) o (R)-FBPMe en presencia de ASH o ASB, en un intervalo de concentraciones comprendido entre 10:1 y 0.5:1 (disoluciones preparadas en PBS). Esta serie de disoluciones fueron preparadas como se detalla a continuación: sobre una disolución 2.5×10^{-5} M de (S) o (R)-FBPMe se añadió una alícuota de una disolución 2×10^{-3} M de AS; la mezcla resultante se guardó durante 15 horas a 4 °C para asegurar un completo equilibrio en

la formación del complejo fármaco/proteína. Pasado este tiempo, la muestra se sometió a FDL. A continuación, se describe de forma más detallada la preparación de la mezcla FBPMe/SA a una relación de concentración 10:1: sobre 20 mL de una disolución 2.5×10^{-5} M de FBPMe en PBS se añadieron 25 μ L de una disolución de AS (2×10^{-3} M) en PBS. La disolución se mantuvo a 4 °C durante 15h. Pasado este tiempo, se tomaron 4 mL de esta disolución y se introdujeron en la cubeta de cuarzo, sometiéndose posteriormente a FDL. La señal se monitorizó a 360 nm por acumulación de las cinéticas obtenidas tras 10 pulsos de láser. El experimento se realizó por triplicado con muestra fresca. Para la obtención del espectro de la especie transitoria desde 700 a 290 nm, la muestra se sometió a FDL a intervalos de longitud de onda de 10 nm (2 pulsos de láser por cada longitud de onda). El procedimiento experimental seguido para el resto de mezclas FBPMe/AS (de 7.5:1 a 0.5:1) fue el mismo que el explicado anteriormente.

Los análisis de regresión de las cinéticas de desactivación de orden 1, 2 y 3, se realizaron haciendo uso de las ecuaciones exponenciales que se indican a continuación:

✓ *Desactivación monoexponencial*

$$\Delta DO = \Delta DO_0 + A_1 e^{(-t/\tau_1)} \quad (5.1)$$

✓ *Desactivación biexponencial*

$$\Delta DO = \Delta DO_0 + A_2 e^{(-t/\tau_2)} + A_3 e^{(-t/\tau_3)} \quad (5.2)$$

✓ *Desactivación multiexponencial*

$$\Delta DO = \Delta DO_0 + A_1 e^{(-t/\tau_1)} + A_2 e^{(-t/\tau_2)} + A_3 e^{(-t/\tau_3)} \quad (5.3)$$

donde ΔDO es la absorbancia de triplete del FBPMe, A_1 permite estimar la cantidad de FBPMe libre en disolución, mientras que A_2 y A_3 permiten conocer la cantidad de FBPMe unido al sitio I y II de unión de la albúmina sérica. Así pues, la ecuación 5.1 se utilizó para determinar el tiempo de vida media del FBPMe libre en disolución, la ecuación 5.2 se usó para determinar el tiempo de vida media y la proporción de FBPMe unido al sitio I y sitio II de unión de la albúmina sérica en condiciones de no saturación de la proteína (con los valores de A_2 y A_3 se obtuvo la proporción de fármaco unido en ambos sitios de unión). Por tanto, τ_1 corresponde al tiempo de vida de triplete del FBPMe libre en disolución, mientras que τ_2 y τ_3 corresponden al tiempo de vida de triplete del FBPMe unido al sitio I o sitio II de unión de la albúmina sérica. Finalmente, la ecuación 5.3 se utilizó para conocer la proporción de FBPMe libre en disolución y unido en ambos sitios de unión de AS en condiciones de saturación de la proteína.

Con respecto a la interacción competitiva de FBPMe en una mezcla ASH-ASB, los porcentajes de FBPMe unido a los distintos sitios de unión en ambas albúminas se calcularon por análisis de regresión de la cinética de desactivación del estado excitado triplete del FBPMe, haciendo uso de la ecuación 5.4.

$$\Delta DO = \Delta DO_0 + A_1 e^{(-t/\tau_1)} + \varphi_1 A_1 e^{(-t/\tau_2)} + A_2 e^{(-t/\tau_3)} + \varphi_2 A_2 e^{(-t/\tau_4)} \quad (5.4)$$

donde A_1 permite que se conozca la cantidad de FBPMe unido en el sitio I de unión de una de las proteínas (ASH), τ_1 es el tiempo de vida del estado excitado triplete del FBPMe en el sitio I de unión en ASH, φ_1 es un factor de proporcionalidad, el cual opera en función de A_1 , es decir, se está mostrando el porcentaje de FBPMe unido en el sitio II en función de la proporción unida en el sitio I. Así pues, el producto $\varphi_1 \cdot A_1$ indica el porcentaje de FBPMe unido en el sitio II de ASH; τ_2 es el tiempo de vida de triplete del FBPMe en el sitio II. Por tanto, con A_2 se puede estimar la cantidad de FBPMe unido en el sitio I de ASB, τ_3 es el tiempo de vida de triplete del FBPMe en el sitio I de ASB, φ_2 es el factor de proporcionalidad, donde $\varphi_2 \cdot A_2$ hace referencia al porcentaje de FBPMe unido en el sitio II de ASB, y τ_4 es el tiempo de vida de triplete del FBPMe en el sitio II en ASB.

5.5. Referencias bibliográficas

1. Peters, T. *All About Albumin; Biochemistry, Genetics and Medical Applications*, Academic Press, **1995**.
2. Li, B. X., Zhang, Z. J., Zhao, L. X. *Anal. Chim. Acta.* **2002**; 468: 65.
3. Kwing, T. C. *Clin. Chim. Acta.* **1985**; 151: 193.
4. Svenson, C. K., Woodruff, M. N., Baxter, J. G., Lalka, D. *Clin. Pharmacokinet.* **1985**; 11: 450.
5. Peters, T. *Adv. Protein Chem.* **1985**; 37: 161.
6. Lhiaubet-Vallet, V., Sarabia, Z., Boscá, F., Miranda, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**; 126: 9538.
7. Lhiaubet-Vallet, V., Boscá, F., Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B.* **2007**; 111: 423.
8. Carter, D. C., Ho, J. X. *Adv. Protein Chem.* **1994**; 45: 153-203.
9. He, K. M., Carter, D. C. *Nature.* **1992**; 358: 29.
10. Dockal, M., Carter, D. C., Rüker, F. *J. Biol. Chem.* **1999**; 274: 29303.
11. Sudlow, G., Birkett, D. J., Wade, D. N., *Mol. Pharmacol.* **1976**; 12: 1052.
12. Sun, P., Hoops, A., Hartwick, R. A. *J. Chrom. B.* **1994**; 661: 335.
13. Wei, S., Zhao, L., Cheng, X., Lin, J.-M. *Analytica Chim. Acta.* **2005**; 545: 65.
14. Gelamo, E. L., Silva, C. H. T. P., Imasato, H., Tabak, M. *Biochim. Biophys. Acta.* **2002**; 1594: 84.
15. Kuchimanchi, K. R., Ahmed, M. S., Johnston, T. P., Mitra, A. K. *J. Pharm. Sci.* **2001**; 90: 659.
16. Silva, D., Cortez, C., Louro, S. R. W. *Spectrochim. Acta, Part A* **2004**; 60A: 1215.
17. Kitamura, K., Kume, M., Yamamoto, M., Takegami, S., Kitade, T. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**; 36: 411.

18. Lopicque, F., Muller, N., Payan, E., Dubois, N. *Clin. Pharmacokinet.* **1993**; 25: 115.
19. Rahman, M. H., Yamasaki, K., Shin, Y.-H., Lin, C. C., Otagiri, M. *Biol. Pharm. Bull.* **1993**; 16: 1169.
20. Bohne, C., Barra, M., Boch, R., Abuin, E. B., Scaiano, J. C. J. *Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1992**; 65: 249.
21. Jiménez, M. C., Miranda, M. A., Tormos, R., Vayá, I. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**; 3: 1038.
22. Morrone, R., Nicolosi, G., Patti, A., Piattelli, M. *Tetrahedron: Asymmetry.* **1995**; 6: 1773.
23. Fehske, K. J., Müller, K. J., Schläfer, U., Wollert, U. *Prog. Drug. Protein Binding.* **1981**; 5-15.

CAPÍTULO 6. Estudio de las interacciones FBP/AS

6.1. Introducción

En vista de los resultados obtenidos en el estudio de la interacción del FBPM_e con ASH y ASB (Capítulo 5), donde se observó estereodiferenciación en algunos procesos, se extendió el estudio al caso del FBP, ya que ésta es la forma en la que el fármaco se suministra a los pacientes para el tratamiento de diversas dolencias.¹⁻³

Como ya se comentó con anterioridad, el FBP se localiza preferentemente en el sitio II de AS, aunque también, en menor medida, en el sitio I.^{4,5}

Se estudiaron las interacciones que tienen lugar entre el fármaco FBP y ASH o ASB, realizándose una comparativa para el (S)- o (R)-FBP con cada tipo de albúmina. Para ello se utilizó como sonda el estado excitado triplete del fármaco mediante el uso de la técnica de FDL, observándose los cambios en su tiempo de vida al estar en presencia de proteína. Asimismo, se efectuó un análisis comparativo de la ocupación de los sitios de unión de ambas proteínas por el FBP, con el fin de observar la posible existencia de estereoselectividad en este proceso.

6.2. Resultados y discusión

6.2.1. Sistemas (S)-flurbiprofeno/albúmina sérica

Se estudió el comportamiento del enantiómero (S)- del FBP al interactuar con albúmina sérica humana y bovina.

6.2.1.1. Sistema (S)-FBP/ASH

Para el desarrollo de este trabajo, se prepararon una serie de disoluciones acuosas en tampón fosfato (PBS 0.01 M, pH = 7.4) conteniendo (S)-FBP y ASH en un intervalo de relación de concentraciones (S)-FBP/ASH comprendido entre 10:1 y 0.5:1. La concentración de (S)-FBP se mantuvo en todo momento constante (2.5×10^{-5} M), variando la de ASH. Estas disoluciones se sometieron a FDL ($\lambda_{\text{ex}} = 266$ nm). Se siguió este procedimiento experimental con el propósito de obtener una señal de absorbancia de triplete del (S)-FBP reproducible, con el fin de minimizar los errores en el posterior análisis de regresión de la cinética de desaparición de la señal obtenida.

En todos los casos, el espectro de absorción de la especie transitoria obtenida después de la excitación del láser ($\lambda_{\text{ex}} = 266$ nm) mostró un máximo a 360 nm, correspondiente al primer estado excitado triplete del FBP.⁶ La desactivación de la señal registrada a 360 nm en ausencia de ASH y atmósfera de aire siguió una ley exponencial de primer orden, con un tiempo de vida de 1.5 μ s. Sin embargo, en presencia de ASH la monitorización de la señal a 360 nm se ajustó a un orden multiexponencial, lo cual es indicativo de la localización del FBP

en los distintos sitios de unión de ASH. Además el tiempo de vida de triplete aumentó notablemente, como se observa en la Figura 6.1.

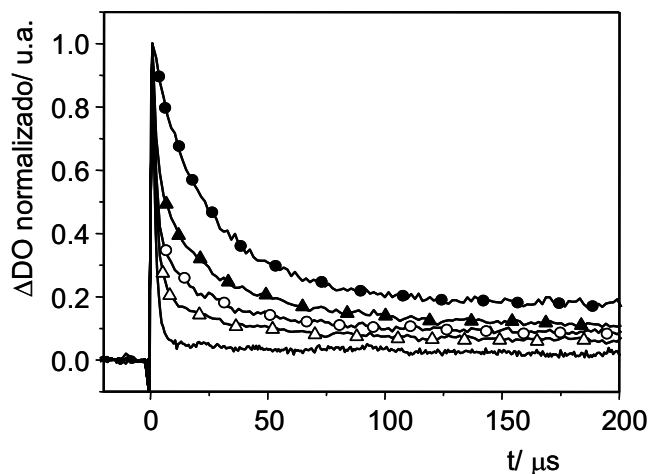


Figura 6.1. Fotólisis de destello láser ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) del (S)-FBP (—) y (S)-FBP/ASH a las relaciones de concentración 7.5:1 (Δ), 5.0:1 (\circ), 2.5:1 (\blacktriangle) y 0.7:1 (\bullet). La señal de desactivación monitorizada a 360 nm ha sido normalizada. La concentración de (S)-FBP fue de $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ en todos los casos.

Cuando el rango de concentraciones (S)-FBP/ASH fue menor de 0.8:1, la desactivación de la señal a 360 nm siguió una ley exponencial de segundo orden, con tiempos de vida de 11.2 y 35.9 μs . La ausencia de la componente de 1.5 μs indica la no existencia de (S)-FBP libre en disolución en estas condiciones. El hecho de encontrar dos tiempos de vida de triplete (τ_T) distintos cuando el FBP está unido a la albúmina se correlaciona bien con la existencia de los dos sitios de unión en ASH (sitio I y sitio II).

Con el propósito de asignar los tiempos de vida de triplete del (S)-FBP (11.2 y 35.9 μs en presencia de proteína) en el sitio I o sitio II de ASH, se determinó la ocupación de estos por análisis de regresión de las cinéticas de desaparición de triplete ($\lambda_{\text{máx}} = 360 \text{ nm}$) en la mezcla

(S)-FBP/ASH a la relación de concentración 0.7:1 (donde no se observa la componente de 1.5 μs correspondiente al (S)-FBP libre en disolución). Esto permitió conocer los valores de A correspondientes a las dos componentes de diferentes tiempos de vida, las cuales se asocian a la cantidad de FBP unido al sitio I o sitio II de ASH. Debido a que el FBP tiene mayor afinidad por el sitio II de la albúmina,⁵ el coeficiente A de mayor valor, en estas condiciones de no saturación de ASH, se asignó al fármaco unido al sitio II de la albúmina, que corresponde con el de mayor tiempo de vida de triplete (35.9 μs). Sin embargo, el coeficiente A de menor valor se asignó al FBP unido en el sitio I de menor afinidad de la albúmina, el cual corresponde con el valor tiempo de vida menor (11.2 μs).

Por otro lado, a relaciones de concentración (S)-FBP/ASH mayores (entre 0.8:1 y 10:1) fue necesario disponer de los tres valores de tiempos de vida (1.5, 11.2 y 35.9 μs) para obtener un buen ajuste exponencial de la cinética de desactivación de triplete. Este hecho se asoció a la existencia de (S)-FBP libre en disolución junto con (S)-FBP presente en ambos sitios de unión de ASH.

Al igual que ocurría en el sistema FBPM_e/AS, los tiempos de vida de triplete de (S)-FBP son mayores cuando está unido a ASH que estando libre en disolución (hasta 24 veces superiores). Este fenómeno puede deberse a la menor desactivación del estado excitado triplete del fármaco cuando se encuentra en el interior de la albúmina sérica humana, ya que el entorno que rodea al FBP puede proteger su estado excitado triplete frente al ataque de diversos agentes, como una segunda molécula de (S)-FBP, oxígeno u otros reactivos. Para constatar esta hipótesis, se realizaron experimentos similares en atmósfera de nitrógeno y de oxígeno, purgando las disoluciones de (S)-FBP en PBS tanto en ausencia como en presencia de ASH. Así, se observó que la

desactivación del triplete del (S)-FBP es más rápida cuando aumenta la concentración de oxígeno (Figura 6.2).

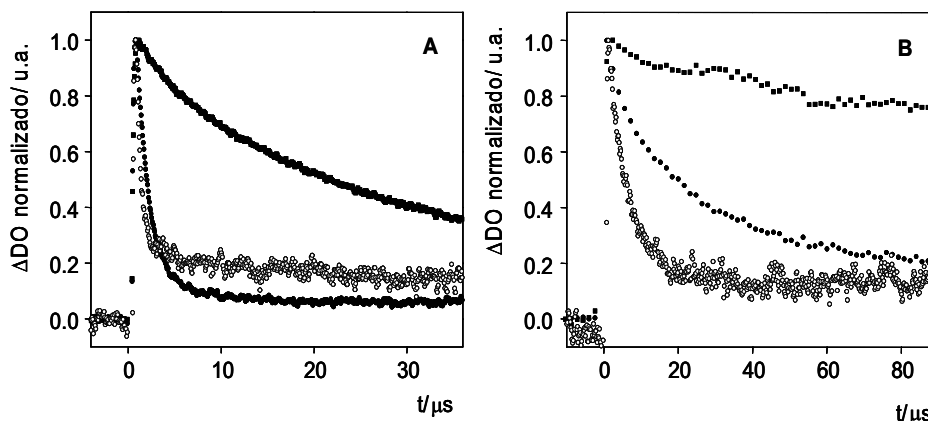


Figura 6.2. **A)** Fotólisis de destello láser ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) del (S)-FBP en N_2 (■), aire (●) y O_2 (○), a concentración $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$. **B)** Fotólisis de destello láser ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) de (S)-FBP/ASH (relación de concentraciones 1:1, $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$) en N_2 (■), aire (●) y O_2 (○).

Las constantes de desactivación por oxígeno ($k_D(\text{O}_2)$) del estado excitado triplete del (S)-FBP libre en disolución y unido en ambos sitios de unión de ASH (sitio I y sitio II) se muestran en la Tabla 6.1. De los valores de $k_D(\text{O}_2)$ se dedujo que el proceso de desactivación del triplete del (S)-FBP en el interior de la proteína es más lento que cuando se encuentra libre en disolución. Además, la protección frente al ataque del oxígeno parece ser más efectiva en el sitio II, sitio de mayor afinidad para FBP, que en el sitio I.

	Entorno	$k_D(O_2) M^{-1} s^{-1}$
(S)-FBP	Disolución	1×10^9
(S)-FBP/ASH ^a	Sitio I	2.1×10^8
	Sitio II	9.1×10^7
(S)-FBP/ASB ^a	Sitio I	4.0×10^8
	Sitio II	3.4×10^7

Tabla 6.1. Constantes de desactivación de triplete por O₂ del (S)-FBP libre, unido al sitio I y al sitio II de ASH y ASB. ^a Relación de concentraciones 0.7:1.

Con el fin de confirmar la correcta asignación de los sitios I y II de unión del (S)-FBP en ASH, se llevaron a cabo experimentos de FDL en presencia de (S)-ibuprofeno ((S)-IBP) y ácido cáprico (AC), ya que es conocido que tanto IBP como AC interaccionan de forma específica en el sitio II de la albúmina.^{7,8} Así pues, la adición de (S)-IBP o AC sobre una mezcla (S)-FBP/ASH dio como resultado una disminución de la contribución correspondiente a la componente de mayor tiempo de vida de triplete ($\tau_T = 35.9 \mu s$), asignado al FBP en el sitio II de ASH. Como consecuencia de ello, se produjo un aumento de las componentes (S)-FBP libre y unido al sitio I de ASH. Así pues, tanto (S)-IBP como AC desplazan al (S)-FBP del sitio II, que se relocaliza en parte en el sitio I de menor afinidad, y también da lugar a un aumento en la concentración libre de éste en disolución. Los porcentajes de (S)-FBP libre, unido al sitio I y sitio II de ASH, para mezclas (S)-FBP/ASH en presencia de (S)-IBP o AC se muestran en la Tabla 6.2.

	% Libre	% Sitio I	% Sitio II
(S)-FBP	100	-	-
(S)-FBP/ASH ^a	0	40	60
(S)-FBP/ASH/(S)-IBP ^b	27	65	8
(S)-FBP/ASH/AC ^b	29	59	12

Tabla 6.2. Porcentajes de (S)-FBP libre, unido al sitio I y al sitio II de ASH en distintas condiciones. ^a Relación de concentraciones 0.7:1. ^b Relación de concentraciones 0.7:1:1.

Una vez confirmada la asignación de (S)-FBP en los distintos sitios de unión, se procedió a determinar la ocupación de los sitios I y II en ASH y la proporción de (S)-FBP libre en disolución de mezclas (S)-FBP/ASH a distintas relaciones de concentración (de 10:1 a 0.5:1). Para ello, se fijaron los tiempos de vida obtenidos anteriormente (1.5, 11.2 y 35.9 μ s). De esta forma, mediante la realización del ajuste multiexponencial de la desactivación del (S)-FBP en presencia de albúmina, para cada una de las distintas relaciones molares, se obtuvieron los valores de A que permitieron determinar la proporción de (S)-FBP libre en disolución, unido al sitio I y al sitio II de ASH. Se observó que a una relación de concentración inferior a 0.8:1 no quedaba (S)-FBP libre en disolución. La distribución de (S)-FBP libre y unido a los sitios I y II de unión de ASH se muestra en la Figura 6.3.

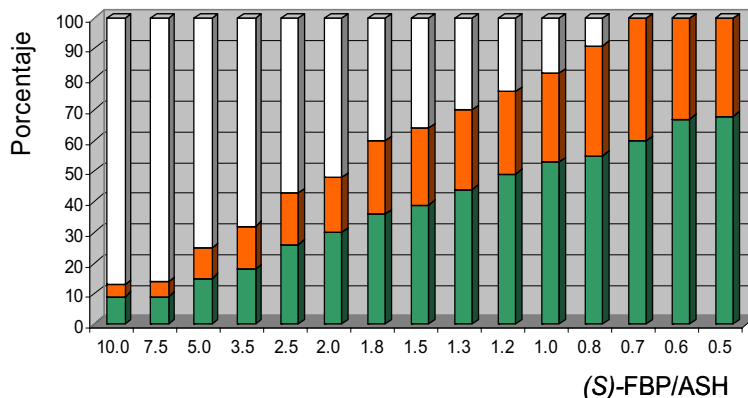


Figura 6.3. Porcentaje de (S)-FBP: libre (blanco), unido al sitio II (verde) y al sitio I (naranja) de ASH.

6.2.1.2. Sistema (S)-FBP/ASB

Para estudiar el comportamiento de (S)-FBP en albúmina sérica bovina, se siguió el mismo procedimiento experimental que en el caso de ASH. Así pues, se prepararon diversas disoluciones donde la concentración de (S)-FBP se mantuvo constante (2.5×10^{-5} M), mientras que la de ASB era variable. Las mezclas se prepararon en disolución de PBS 0.01 M (pH = 7.4), donde la relación de concentraciones (S)-FBP/ASB variaba de 10:1 a 0.5:1. Estas se sometieron a FDL ($\lambda_{\text{ex}} = 266$ nm). De nuevo, para valores (S)-FBP/ASB menores de 0.7:1, se obtuvieron dos componentes de la señal de desactivación de triplete del (S)-FBP ($\lambda_{\text{máx}} = 360$ nm) correspondientes a dos τ_T diferentes al del (S)-FBP libre, lo que indica que todo el (S)-FBP se encuentra en el interior de la proteína (Figura 6.4). Los valores obtenidos fueron de $\tau_T = 10.8$ y $86.5 \mu\text{s}$, respectivamente. La ausencia de la componente de $1.5 \mu\text{s}$ indica la no existencia de (S)-FBP libre en disolución en estas condiciones.

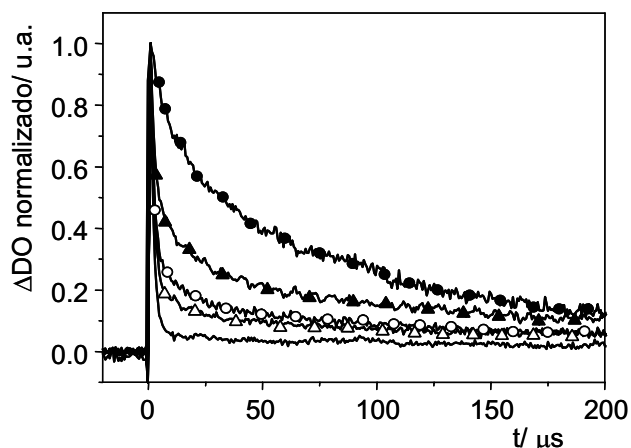


Figura 6.4. Fotólisis de destello láser ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) del (S)-FBP (—) y (S)-FBP/ASB a las relaciones de concentración 7.5:1 (Δ), 5.0:1 (\circ), 2.5:1 (\blacktriangle) y 0.7:1 (\bullet). La señal de desactivación monitorizada a 360 nm ha sido normalizada. La concentración de (S)-FBP fue de $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ en todos los casos.

El análisis de regresión de la cinética de desactivación de la mezcla (S)-FBP/ASB a la relación de concentración 0.6:1 permitió obtener los valores de los coeficientes A, y a partir de ellos se pudo asignar cada tiempo de vida de triplete con la unión del (S)-FBP en el sitio I o II de ASB. Así pues, la componente $\tau_T = 86.5 \mu\text{s}$ se asignó a la interacción de (S)-FBP en el sitio II de ASB, mientras que la componente $\tau_T = 10.8 \mu\text{s}$ se asignó a la interacción de (S)-FBP en el sitio I. Sin embargo, cuando la relación de concentraciones fue mayor (entre 0.7:1 y 10:1) resultó necesario disponer de los tres tiempos de vida de triplete (1.5, 10.8 y 86.5 μs) para obtener un buen ajuste exponencial, lo que se asoció a la existencia de (S)-FBP libre en disolución junto con la cantidad de (S)-FBP localizado en ambos sitios de ASB.

Para este caso, también se realizó el cálculo de $k_D(\text{O}_2)$ en los sitios I y II de ASB (Tabla 6.1). Nuevamente se observó que el proceso

de desactivación del triplete del (S)-FBP fue más lento en el interior de la proteína que en disolución; además, la protección frente al ataque de O₂ pareció ser más efectiva en el sitio II de ASB.

Los experimentos realizados en presencia de (S)-IBP y AC corroboraron la correlación entre los tiempos de vida de triplete y la presencia de (S)-FBP en cada sitio de unión en ASB. Así pues, la adición de (S)-IBP o AC sobre una mezcla (S)-FBP/ASB, condujo a una disminución de la proporción de (S)-FBP unido al sitio II de ASB, con el consiguiente aumento en la proporción de (S)-FBP libre y unido al sitio I (Tabla 6.3).

	% Libre	% Sitio I	% Sitio II
(S)-FBP	100	-	-
(S)-FBP/ASB ^a	0	39	61
(S)-FBP/ASB/(S)-IBP ^b	8	58	34
(S)-FBP/ASB/AC ^b	5	57	38

Tabla 6.3. Porcentajes de (S)-FBP libre, unido al sitio I y al sitio II de ASB en distintas condiciones. ^a Relación de concentraciones 0.7:1. ^b Relación de concentraciones 0.7:1:1.

A continuación, se determinó la proporción de (S)-FBP en los sitios I y II en ASB y libre en disolución (Figura 6.5) para las mezclas (S)-FBP/ASB a un intervalo de relación de concentraciones comprendido entre 10:1 y 0.5:1 (el procedimiento seguido fue el mismo que en ASH).

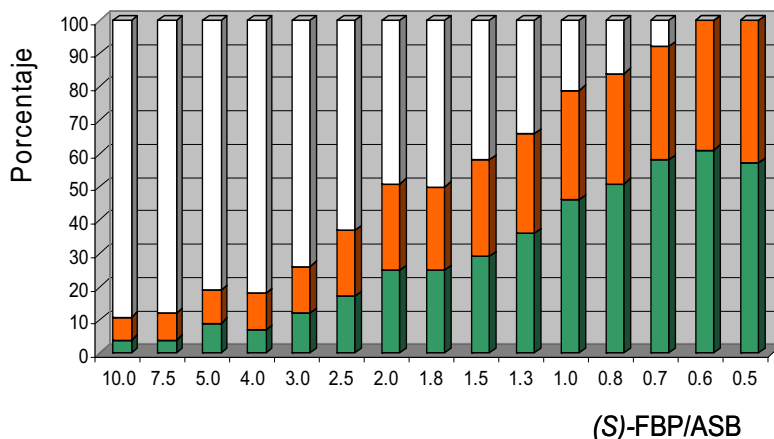


Figura 6.5. Porcentaje de (S)-FBP: libre (blanco), unido al sitio II (verde) y al sitio I (naranja) de ASB.

Resulta interesante resaltar que el tiempo de vida de triplete del (S)-FBP en el sitio II es 2.4 veces mayor cuando el fármaco está unido a ASB ($\tau_T = 86.5 \mu s$) que cuando se encuentra en ASH ($\tau_T = 35.9 \mu s$). Sin embargo, no existen diferencias cuando el (S)-FBP interacciona en el sitio I de unión de ambas proteínas. Los resultados obtenidos indican que el estado excitado triplete del (S)-FBP está más protegido frente a la desactivación dentro del sitio II de la albúmina sérica bovina. Además, parece ser que en este sitio el (S)-FBP se une con una afinidad mayor en ASB que en ASH, ya que el desplazamiento de (S)-FBP con (S)-IBP o AC resulta más difícil aquí que en los otros sitios de unión de las albúminas (ver Tablas 6.2 y 6.3). Un segundo hecho que apoya esta suposición corresponde con la desactivación del estado excitado triplete del (S)-FBP por O_2 (Tabla 6.1), ya que la constante de desactivación ($k_D(O_2)$) en ASB es menor que en ASH, especialmente en el sitio II de ASB.

Por otra parte, a partir de los coeficientes de regresión A de las cinéticas de desactivación, se observó que las diferencias existentes en

el comportamiento del (S)-FBP en cada una de las dos proteínas eran más claras cuando las relaciones de concentración (S)-FBP/AS eran bajas. Este fenómeno queda reflejado en la Figura 6.6. Para el caso (S)-FBP/ASH, cuando la relación de concentraciones se encontró en el intervalo 0.5:1 y 2:1, se observaron diferencias en la ocupación de ambos sitios de unión por el (S)-FBP, mientras que en el caso de ASB estas diferencias ocurrían en el rango de concentraciones entre 0.5:1 y 1:1.

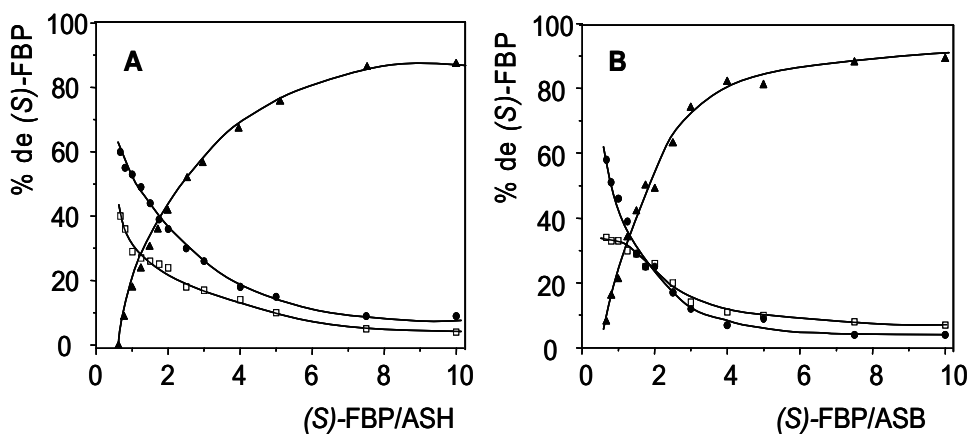


Figura 6.6. A) Porcentaje de (S)-FBP en presencia de ASH a diferentes proporciones (S)-FBP/ASH; libre (▲), unido a sitio I (□) y unido a sitio II (●). **B)** Porcentaje de (S)-FBP en presencia de ASB a diferentes proporciones (S)-FBP/ASB; libre (▲), unido al sitio I (□) y al sitio II (●).

6.2.2. Sistemas (R)-flurbiprofeno/albúmina sérica

Con el propósito de investigar la existencia de posibles diferencias en el comportamiento de ambos enantiómeros al interaccionar con las proteínas, se realizó un estudio similar al anterior con el (R)-FBP en presencia de las dos albúminas séricas.

6.2.2.1. Sistema (R)-FBP/ASH

Como en el experimento anterior, se prepararon una serie de disoluciones acuosas en PBS 0.01 M (pH = 7.4) conteniendo (R)-FBP y ASH a distintas concentraciones, donde la relación de concentración (R)-FBP/ASH variaba entre 10:1 y 0.5:1. El tiempo de vida de triplete del (R)-FBP ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) fue de $1.5 \mu\text{s}$. También se observaron dos tiempos de vida de triplete distintos al encontrarse el (R)-FBP en el interior de ASH (a relación de concentración menor de 0.7:1). Estos tiempos de vida fueron ligeramente distintos a los obtenidos con el enantiómero (S)-, indicando la existencia de una pequeña estereoselectividad en la interacción del fármaco con ASH. Estos valores se asignaron a la unión de (R)-FBP en el sitio I ($\tau_{\text{T}} = 10.2 \mu\text{s}$) y II ($\tau_{\text{T}} = 39.0 \mu\text{s}$) de ASH. La Figura 6.7 muestra las cinéticas de desactivación del (R)-FBP libre en disolución y de distintas mezclas (R)-FBP/ASH.

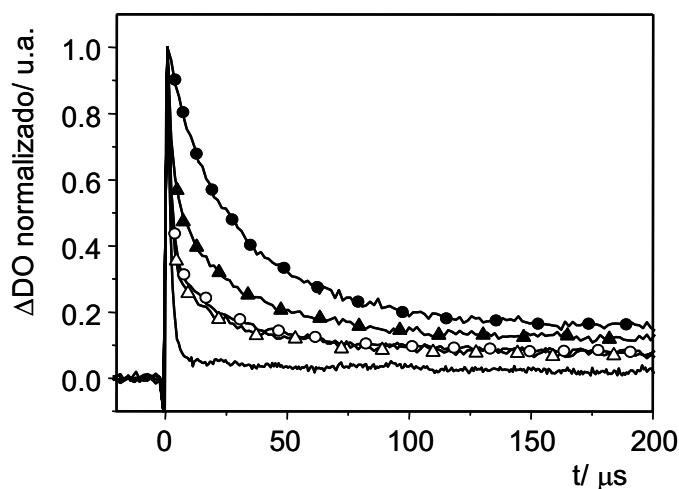


Figura 6.7. Fotólisis de destello láser ($\lambda_{ex} = 266$ nm) del (R)-FBP (—) y (R)-FBP/ASH a las relaciones de concentración 7.5:1 (Δ), 5.0:1 (\circ), 2.5:1 (\blacktriangle) y 0.7:1 (\bullet). La señal de desactivación monitorizada a 360 nm ha sido normalizada. La concentración de (R)-FBP fue de 2.5×10^{-5} M en todos los casos.

De nuevo, los tiempos de vida de triplete obtenidos para el (R)-FBP en el interior de ASH son mayores que cuando se encuentra libre en disolución. Se observó que la desactivación del triplete fue mayor al aumentar la concentración de oxígeno (Figura 6.8). Se calcularon los valores de $k_D(O_2)$ para el (R)-FBP en presencia de ambas albúminas (Tabla 6.4).

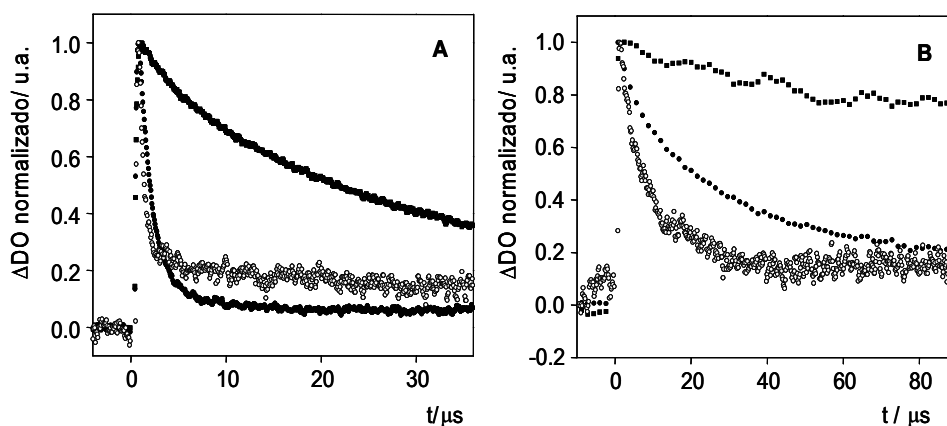


Figura 6.8. **A)** Fotólisis de destello láser ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) del (*R*)-FBP en N_2 (■), aire (●) y O_2 (○), a concentración $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$. **B)** Fotólisis de destello láser ($\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$) de (*R*)-FBP/ASH (relación de concentraciones 1:1, $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$) en N_2 (■), aire (●) y O_2 (○).

Se sigue observando, por los valores de $k_D(\text{O}_2)$ obtenidos, que el proceso de desactivación del triplete del (*R*)-FBP en el interior de la proteína fue más lento que cuando este se encontró libre en disolución. Además, la protección frente al ataque de O_2 pareció ser más efectiva en el sitio II.

	Entorno	$k_D(\text{O}_2) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
(<i>R</i>)-FBP	Disolución	1×10^9
(<i>R</i>)-FBP/ASH ^a	Sitio I	2.0×10^8
	Sitio II	3.9×10^7
(<i>R</i>)-FBP/ASB ^a	Sitio I	1.9×10^8
	Sitio II	4.6×10^7

Tabla 6.4. Constantes de desactivación de triplete por O_2 del (*R*)-FBP libre, unido al sitio I y al sitio II de ASH y ASB. ^a Relación de concentraciones 0.7:1.

Los experimentos de FDL realizados a distintas relaciones de concentración (R)-FBP/ASH en presencia de (S)-IBP y AC confirmaron la asignación de los tiempos de vida de triplete con la interacción del (R)-FBP en el sitio I o II de ASH. Así pues, la adición de (S)-IBP o AC a las mezclas (R)-FBP/ASH resultó en un notable descenso en la cantidad de (R)-FBP unido al sitio II de ASH, produciéndose el correspondiente aumento en la concentración de (R)-FBP libre en disolución y unido al sitio I. La Tabla 6.5 muestra la proporción de (R)-FBP unido a ASH y ASB (a una relación de concentración (R)-FBP/AS 0.7:1), así como la obtenida tras la adición de (S)-IBP y AC en las mezclas realizadas para ambas albúminas.

	% Libre	% Sitio I	% Sitio II
(R)-FBP	100	-	-
(R)-FBP/ASH ^a	0	30	70
(R)-FBP/ASH/(S)-IBP ^b	22	59	19
(R)-FBP/ASH/AC ^b	26	61	13
(R)-FBP/ASB ^a	0	33	67
(R)-FBP/ASB/(S)-IBP ^b	0	56	44
(R)-FBP/ASB/AC ^b	0	50	50

Tabla 6.5. Porcentajes de (R)-FBP libre, unido al sitio I y al sitio II de ASH y ASB en distintas condiciones. ^a Relación de concentraciones 0.7:1. ^b Relación de concentraciones 0.7:1:1.

La determinación de la proporción de (R)-FBP en los sitios I y II en ASH y libre en disolución (Figura 6.9) de mezclas (R)-FBP/ASH (relación molar entre 10:1 y 0.5:1) se realizó mediante análisis de regresión de las cinéticas de desactivación, obteniendo los valores de

los coeficientes A . Para ello, se mantuvieron fijos los tiempos de vida de triplete obtenidos para el (R)-FBP libre en disolución ($1.5 \mu\text{s}$) y unido a los sitios I y II de ASH (10.2 y $39.0 \mu\text{s}$, respectivamente).

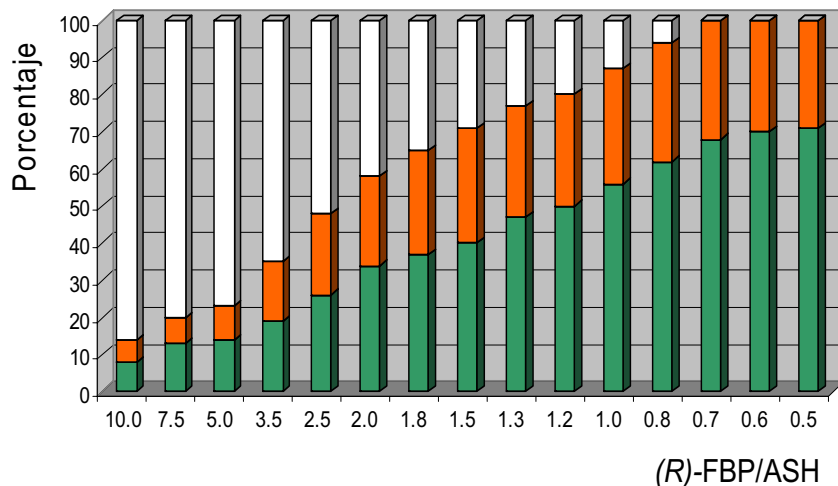


Figura 6.9. Porcentaje de (R)-FBP: libre (blanco), unido al sitio II (verde) y al sitio I (naranja) de ASH.

6.2.2.2. Sistema (R)-FBP/ASB

Finalmente se estudió el comportamiento de (R)-FBP en presencia de ASB. Cuando la mezcla (R)-FBP/ASB (relación de concentración 0.7:1) se sometió a FDL, de la cinética de desactivación del estado excitado triplete del FBP se obtuvieron dos valores de tiempo de vida, asignados al sitio I ($\tau_T = 6.6 \mu\text{s}$) y sitio II ($\tau_T = 58.6 \mu\text{s}$) de unión del (R)-FBP en la proteína. La Figura 6.10 muestra las cinéticas de desactivación del (R)-FBP libre en disolución y de distintas mezclas (R)-FBP/ASB.

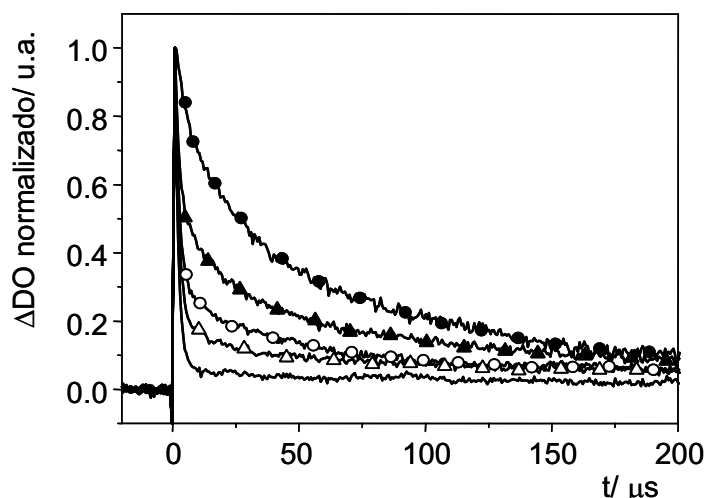


Figura 6.10. Fotólisis de destello láser ($\lambda_{ex} = 266$ nm) del (R)-FBP (—) y (R)-FBP/ASB a las relaciones de concentración 7.5:1 (Δ), 5.0:1 (\circ), 2.5:1 (\blacktriangle) y 0.7:1 (\bullet). La señal de desactivación monitorizada a 360 nm ha sido normalizada. La concentración de (R)-FBP fue de 2.5×10^{-5} M en todos los casos.

Los experimentos de desactivación por oxígeno mostraron unos resultados similares a los obtenidos anteriormente. Nuevamente se observó que la desactivación del estado excitado triplete del (R)-FBP fue mayor al aumentar la concentración de O_2 (Tabla 6.4). Además, esta desactivación fue menor al encontrarse el (R)-FBP en el interior de ASB, siendo la protección frente al ataque de O_2 más efectiva en el sitio II.

Por otra parte, la adición de (S)-IBP o AC sobre mezclas (R)-FBP/ASB resultó en una redistribución del fármaco en la proteína, ya que este pasó del sitio II al sitio I de ASB (Tabla 6.5). Así pues, en estas condiciones no se detectó (R)-FBP libre en disolución.

La proporción de (R)-FBP en ambos sitios de unión de ASB y libre en disolución en mezclas (R)-FBP/ASB (relaciones molares entre 10:1 y 0.5:1) se muestra en la Figura 6.11.

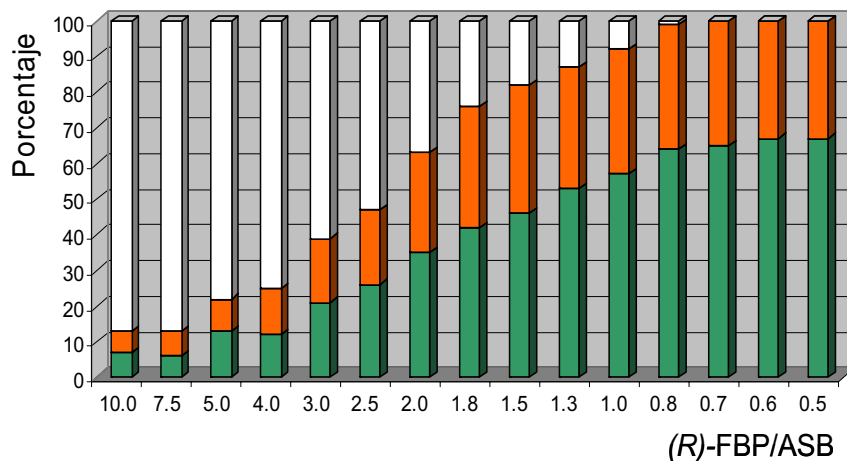


Figura 6.11. Porcentaje de (R)-FBP: libre (blanco), unido al sitio II (verde) y al sitio I (naranja) de ASB.

La Figura 6.12 muestra una comparativa de los porcentajes de ocupación de los sitios de unión I y II en ambas proteínas.

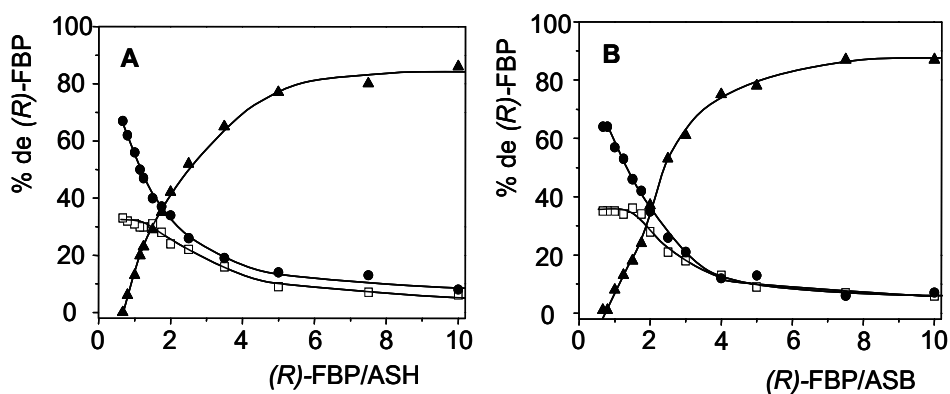


Figura 6.12. A) Porcentaje de (R)-FBP en presencia de ASH a diferentes proporciones (R)-FBP/ASH; libre (▲), unido a sitio I (□) y unido a sitio II (●). **B)** Porcentaje de (R)-FBP en presencia de ASB a diferentes proporciones (R)-FBP/ASB; libre (▲), unido al sitio I (□) y al sitio II (●).

Nuevamente, las principales diferencias en el comportamiento de (*R*)-FBP en ambas proteínas se observó cuando las relaciones de concentración (*R*)-FBP/AS fueron bajas.

En la Figura 6.13 se muestra una comparativa entre las cinéticas de desactivación del estado excitado triplete del (*S*)- y (*R*)-FBP ($\lambda_{\text{máx}} = 360$ nm) en presencia de ASH y ASB. Se observó que la interacción del FBP fue diferente en las dos proteínas, debido a esa menor desactivación del triplete del fármaco en ASB. Además, parece existir una pequeña estereoselectividad en la interacción del FBP con ASB, cosa que no ocurre en el caso de ASH.

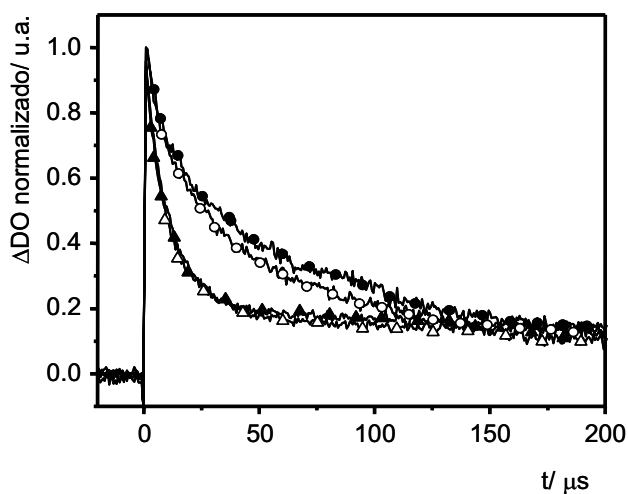


Figura 6.13. Cinética de desactivación del triplete del flurbiprofeno ($\lambda_{\text{máx}} = 360$ nm) tras FDL ($\lambda_{\text{ex}} = 266$ nm; 0.01 M en PBS, aire) de (*S*)-FBP/ASB (●), (*R*)-FBP/ASB (○), (*S*)-FBP/ASH (▲) y (*R*)-FBP/ASH (Δ). Las relaciones de concentración fármaco/AS se mantuvieron constantes a la relación 0.7:1.

6.3. Conclusiones

Los resultados obtenidos confirman que se puede hacer uso del estado excitado triplete del fármaco flurbiprofeno como parámetro cuantitativo sensible al medio para estudiar las interacciones que tienen lugar con los distintos sitios de unión de proteínas transportadoras, como es el caso de la albúmina sérica humana y bovina.

El análisis de regresión realizado a partir de las cinéticas de desactivación del estado excitado triplete del FBP ha proporcionado información sobre la protección de éste al ataque por una segunda molécula de fármaco o por oxígeno u otros reactivos. El tratamiento matemático de las cinéticas de desactivación de los estados excitados triplete del FBP en presencia de proteína permitió conocer la distribución de éste en los dos sitios de unión de mayor afinidad de la proteína, así como la cantidad de fármaco libre en disolución. Además, la asignación de los sitios de unión I y II ocupados por el FBP está confirmada por los experimentos realizados por el desplazamiento del FBP mediante el uso de sondas selectivas del sitio II de la albúmina (como (S)-ibuprofeno y ácido cáprico).

Por otra parte, tanto los tiempos de vida de triplete como la ocupación de los sitios de unión dependen del tipo de albúmina estudiada (albúmina sérica humana o bovina).

Finalmente, existe una pequeña estereodiferenciación en la interacción del (S)- y (R)-FBP con ASB.

6.4. Parte experimental

6.4.1. Materiales y disolventes

Las albúminas séricas humana y bovina fueron adquiridas de Sigma. El (S)- y (R)-FBP fueron adquiridos de Aldrich. Las disoluciones de PBS 0.01 M (pH = 7.4) empleadas se obtuvieron por disolución de pastillas tampón fosfato adquiridas de Sigma en agua desionizada Milli-Q.

6.4.2. Experimentos de fotólisis de destello láser

Los experimentos de fotólisis de destello láser se realizaron a una longitud de onda de excitación de 266 nm (14 mJ por pulso de láser). Las medidas se llevaron a cabo haciendo uso de una cubeta de cuarzo de 10 x 10 mm², con una capacidad de 4 mL.

La absorbancia de las disoluciones de FBP se mantuvo aproximadamente a 0.2 a la longitud de onda de excitación del láser, la cual corresponde a una concentración de 2.5×10^{-5} M. Los experimentos se realizaron en disolución de PBS (0.01 M, pH = 7.4) a temperatura ambiente (ca. 22 °C) y en atmósfera de aire.

Para los estudios realizados en presencia de albúmina sérica, se prepararon una serie de disoluciones conteniendo (S) y (R)-FBP en presencia de ASH o ASB, en un intervalo de concentraciones comprendido entre 10:1 y 0.5:1 (disoluciones preparadas en PBS). Esta serie de disoluciones fueron preparadas como se detalla a continuación: sobre una disolución 2.5×10^{-5} M de (S) o (R)-FBP se añadió una alícuota de una disolución 2×10^{-3} M de AS; la mezcla resultante se guardó durante 15 horas a 4 °C para asegurar un completo equilibrio en

la formación del complejo fármaco/proteína. Pasado este tiempo, la muestra se sometió a FDL. Como ejemplo, se describe de forma más detallada la preparación de la muestra FBP/SA a una relación de concentración 10:1: sobre 20 mL de una disolución 2.5×10^{-5} M de FBP en PBS se añadieron 25 μ L de una disolución de AS (2×10^{-3} M) en PBS. La disolución se mantuvo a 4 °C durante 15h. Pasado este tiempo, se tomaron 4 mL de esta disolución y se introdujeron en la cubeta de cuarzo. La muestra se sometió a FDL, monitorizando la señal a 360 nm por acumulación de las cinéticas obtenidas tras 10 pulsos de láser. El experimento se realizó por triplicado con muestra fresca. Para la obtención del espectro de la especie transitoria desde 700 a 290 nm, la muestra se sometió a FDL en un intervalo de 10 nm (2 pulsos de láser por cada longitud de onda). El procedimiento experimental seguido para el resto de mezclas FBP/AS (de 7.5:1 a 0.5:1) fue el mismo que el explicado anteriormente.

Los análisis de regresión de las cinéticas de desactivación de orden 1, 2 y 3, se realizaron haciendo uso de las ecuaciones exponenciales que se indican a continuación:

✓ *Desactivación monoexponencial*

$$\Delta DO = \Delta DO_0 + A_1 e^{(-t/\tau_1)} \quad (6.1)$$

✓ *Desactivación biexponencial*

$$\Delta DO = \Delta DO_0 + A_2 e^{(-t/\tau_2)} + A_3 e^{(-t/\tau_3)} \quad (6.2)$$

✓ Desactivación multiexponencial

$$\Delta DO = \Delta DO_0 + A_1 e^{(-t/\tau_1)} + A_2 e^{(-t/\tau_2)} + A_3 e^{(-t/\tau_3)} \quad (6.3)$$

donde ΔDO es la absorbancia de triplete del FBP, A_1 permite estimar la proporción de FBP libre en disolución, mientras que A_2 y A_3 permiten conocer la proporción de FBP unido al sitio I y II de la albúmina sérica. Así pues, la ecuación 6.1 se utilizó para determinar el tiempo de vida del FBP libre en disolución, la ecuación 6.2 se usó para determinar el tiempo de vida y la proporción de FBP unido al sitio I y sitio II de la albúmina sérica en condiciones de no saturación de la proteína (con los valores de A_2 y A_3 se obtuvo la proporción de fármaco unido en ambos sitios de unión). Por tanto, τ_1 corresponde al tiempo de vida de triplete del FBP libre en disolución, mientras que τ_2 y τ_3 corresponden al tiempo de vida de triplete del FBP unido al sitio I o sitio II de la albúmina sérica. Finalmente, la ecuación 6.3 se utilizó para conocer la proporción de FBP libre en disolución y unido en ambos sitios de AS en condiciones de saturación de la proteína.

El cálculo de las constantes de desactivación k_D (O_2) (Tablas 6.1 y 6.4) se realizó haciendo uso de la ecuación de Stern-Volmer⁹ (ecuación 6.4):

$$\frac{I}{\tau_T} = k_0 + k_D \cdot [D] \quad (6.4)$$

donde τ_T es el tiempo de vida de triplete del FBP (libre en disolución o unido al sitio I o sitio II de AS), k_0 es la inversa del tiempo de vida de

triplete del FBP en ausencia de desactivador (O_2), k_D es la constante de desactivación de triplete del FBP por interacción con O_2 , y $[D]$ es la concentración de O_2 . Por tanto, de la pendiente de la recta obtenida tras representar $1/\tau_T$ vs. $[O_2]$, se pudo obtener el valor de $k_D (O_2)$. Como ejemplo, se muestra la gráfica obtenida para la obtención de la constante de desactivación del (S)-FBP unido al sitio I de ASH:

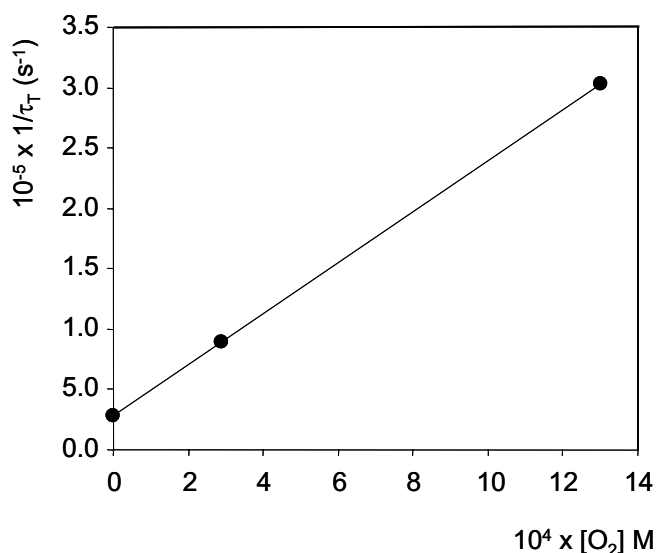


Figura 6.14. Representación Stern-Volmer para calcular el valor de la constante de desactivación del (S)-FBP unido al sitio I de unión de ASH.

De la pendiente de la recta, con un valor del coeficiente de regresión $R^2 = 0.9999$, se obtuvo el valor de $k_D (O_2) = 2.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

6.5. Referencias bibliográficas

1. Rovensky, J., Micekova, D. *Drug. Exp. Clin. Res.* **2000**; 26: 19-24.
2. Bellamy, N., Bensen, W. G., Ford, P. M., Huang, S. H., Lang, J. Y. *Clin. Invest. Med.* **1992**; 15: 427-434.
3. Evans, A.M. *J. Clin. Pharmacol.* **1996**; 36: 7S.
4. Lopicque, F., Muller, N., Payan, E., Dubois, N. *Clin. Pharmacokinet.* **1993**; 25 : 115.
5. Deschamps-Labat, L., Péhourcq, F., Jagou, M., Bannwarth, B. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**; 16: 223.
6. Jiménez, M. C., Miranda, M. A., Tormos, R., Vayá, I. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**; 3: 1038.
7. Itoh, T., Saura, Y., Tsuda, Y., Yamada, H. *Chirality.* **1997** ; 9 : 643.
8. Menke, G., Wörner, W., Kratzer, W., Rietbrock, N. *Arch. Pharmacol.* **1989**; 339 : 42.
9. Wayne, C. E., Wayne, R. P. In *Photochemistry*; Compton, R. G. Ed.; Oxford Chemistry Press, **1996**.

CAPÍTULO 7. Instrumentación

7.1. Instrumentación general

Los espectros de **resonancia magnética nuclear** de protón y carbono (RMN- ^1H y ^{13}C) se registraron en un espectrómetro Varian Gemini de 300 MHz, utilizando como disolvente cloroformo o metanol deuterado. Los valores de desplazamiento químico (δ) son expresados en partes por millón (ppm), y son relativos a la señal del tetrametilsilano (TMS), escogido como referencia para el caso del cloroformo, mientras que en los espectros realizados en metanol deuterado, se usó como referencia la señal propia del metanol a 3.3 ppm. Los valores de las constantes de acoplamiento (J) se indican en hercios (Hz).

Los **espectros de masas** se registraron en un espectrómetro Waters Integrity System, compuesto por una bomba Waters 2695 de cuatro canales y un detector ultravioleta Diode-Array Waters 996, acoplado a un detector de masas con cámara de ionización por impacto electrónico Thermabeam.

Los análisis de **cromatografía de gases-espectrometría de masas** se registraron con un espectrómetro Hewlett Packard HP 6869.

Los **espectros de infrarrojo** se registraron en un espectrómetro de transformada de Fourier FT/IR-460 Plus. Únicamente se han mostrado los desplazamientos de las principales bandas de absorción; ν_{max} (cm^{-1}).

La **difracción de rayos-X de monocristal** se realizó en la Unidad de Rayos-X de la Universidad de Santiago de Compostela.

La determinación por combustión del **análisis elemental** de las muestras se realizó en el Instituto de Química Bio-Orgánica del CSIC en Barcelona.

La determinación de la **temperatura de fusión** de los compuestos se llevó a cabo con un Stuart Scientific SMP3 Advanced Melting Point Apparatus.

7.2. Instrumentación fotoquímica

Los espectros de **absorción ultravioleta-visible** (UV-vis) se registraron en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35.

La determinación de la **rotación óptica** ($[\alpha]_D^{25}$) de los compuestos se realizó haciendo uso de un polarímetro Jasco P-1030, cuya fuente de luz es de Na a 589 nm. El valor de $[\alpha]_D^{25}$ se determinó a una temperatura de 27 °C.

La **irradiación fotoquímica en estado estacionario** de los compuestos se realizó en un fotorreactor multilámpara Luzchem, provisto con 16 lámparas, 8 de las cuales están situadas en los laterales del fotorreactor (4 en cada lateral), y las otras 8 lámparas se encuentran en la parte superior del mismo. Cada lámpara posee una potencia de 8 W. Las longitudes de onda de emisión máxima con las que se puede irradiar son de 254, 300 y 350 nm. El sistema posee un ventilador para la refrigeración de la muestra y un agitador magnético para favorecer la homogeneización de la misma.



Figura 7.1. Fotorreactor multilámpara.

En los experimentos de **fotólisis de destello láser (FDL)**, el sistema utilizado consistió en un láser pulsado de Nd-YAG (Quantel Brilliant, de 266 ó 355 nm, donde los pulsos simples tienen una duración aproximada de 5 ns fwhm) acoplado a un equipo miniaturizado mLFP-111 Luzchem, provisto de un monocromador en el rango de longitudes de onda entre 800-200 nm. Los espectros de las especies transitorias se registraron empleando una cubeta de cuarzo 10 x 10 mm² con una capacidad volumétrica de 4 mL.

Para los experimentos de **fluorescencia en estado estacionario** se utilizaron dos espectrofluorímetros diferentes. Uno de ellos corresponde a un espectrofluorímetro Edinburgh Analytical Instruments modelo FS900 equipado con una lámpara de Xenon de 450 W y provisto de un monocromador M300 en el rango de longitudes de onda entre 900-200 nm. En el segundo caso se utilizó un instrumento de Photon Technology International (PTI), modelo LPS-220B, equipado con

una lámpara de Xenon de 75 W, provisto de un monocromador tipo Czerny-Turner, modelo 101 y un detector Photomultiplier Detection System, modelo 814. Los espectros se registraron empleando una cubeta *Suprasil* de cuarzo 10 x 10 mm² con una capacidad volumétrica de 4 mL.

Las medidas de **fluorescencia en tiempo resuelto** también se realizaron haciendo uso de dos instrumentos distintos. En algunos casos la medida del tiempo de vida de fluorescencia se realizó con un aparato de Edinburgh Analytical Instruments modelo FL900 con lámpara de H₂ como fuente de excitación y un detector “single-photon-counting”, donde la duración del pulso es de 1.5 ns. En otros casos se utilizó un espectrómetro de tiempos de vida de PTI modelo TM-2/2003 equipado con una lámpara de H₂/N₂ (50/50, duración del pulso de 1.8 ns) y un detector estroboscópico.

Conclusiones

Conclusiones

Se han caracterizado los primeros estados excitados singlete y triplete del flurbiprofeno, identificándose sus principales procesos de desactivación. Además, se han determinado los tiempos de vida de los dos estados excitados (singlete y triplete) junto con los rendimientos cuánticos implicados en los procesos fotofísicos.

Los estados excitados singlete y triplete del FBP han mostrado ser sensibles al medio en el que se encuentran, lo cual posibilita su uso como parámetros cuantitativos para estudios relacionados con la naturaleza de las interacciones que tienen lugar entre el FBP y las proteínas. Especialmente, cabe resaltar que el estado excitado triplete es altamente sensible al microambiente que le rodea, lo que lo hace particularmente adecuado para este tipo de estudios.

En el caso de los sistemas modelo, donde el FBP se encuentra covalentemente unido a los aminoácidos Trp y Tyr, el primer estado excitado singlete es altamente sensible a las interacciones intramoleculares fármaco/aminoácido. Los procesos fotofísicos que tienen lugar en las diadas FBP-Trp y FBP-Tyr son distintos. En los sistemas FBP-Trp, al ser irradiados, se alcanza el primer estado excitado singlete del Trp, bien por absorción directa o por transferencia de energía desde el FBP. El $^1\text{Trp}^*$ se desactiva mediante un proceso de transferencia electrónica, el cual está favorecido termodinámicamente. Además, se observa una desactivación estereoselectiva desde el primer estado excitado singlete del FBP, que conduce a la formación de excíplejos detectables por la técnica de fluorescencia. Sin embargo, en los sistemas FBP-Tyr, no se observa un proceso de transferencia de energía del FBP a la Tyr, sino una desactivación estereoselectiva desde el estado excitado singlete del fármaco. Estos procesos de

desactivación intramolecular pueden ser atribuidos a transferencia electrónica (favorecida en disolventes polares) o a formación de exciplejos (favorecida en disolventes apolares). En general, para ninguno de estos sistemas se observa una interacción significativa desde el estado excitado triplete del FBP.

Al pasar a los sistemas donde el flurbiprofeno (bien FBP o FBPM_e) se encuentra en presencia de proteínas transportadoras (ASH o ASB), se observa que el primer estado excitado triplete de FBP o de FBPM_e es altamente sensible a la interacción con la proteína. Por tanto, se puede utilizar como parámetro cuantitativo sensible al microambiente que le rodea, con el fin de estudiar las interacciones que tienen lugar entre FBP o FBPM_e y ASH o ASB.

Mediante los análisis de regresión de las cinéticas de desaparición obtenidas a partir de los experimentos de FDL, se puede calcular la población de los sitios I y II en ASH y ASB por el FBP o FBPM_e, que se correlacionan con las distintas componentes de τ_T .

En general, los tiempos de vida de triplete aumentan considerablemente en presencia de AS, lo cual puede ser debido a la protección frente al ataque por una segunda molécula de fármaco, oxígeno u otros reactivos. Además, en algunos casos se encuentra una importante estereodiferenciación en los tiempos de vida de triplete al estar el flurbiprofeno en presencia de proteína. Por otra parte, tanto los tiempos de vida de triplete como la ocupación de los sitios de unión dependen del tipo de albúmina empleada (albúmina sérica humana o bovina).

Así pues, los resultados obtenidos confirman que se puede hacer uso de la técnica de fotólisis de destello láser para estudiar el estado excitado triplete del fármaco flurbiprofeno y utilizarlo como sonda para el estudio de las interacciones que tienen con los distintos sitios de

unión de proteínas transportadoras, como la albúmina sérica humana y bovina.

Conclusions

The first excited singlet and triplet states of flurbiprofen have been fully characterised, and the main processes leading to their deactivation have been identified. The excited state lifetimes and the quantum yields of the involved photophysical processes have been determined.

Both, the excited singlet and triplet states of FBP have shown to be highly sensitive to the medium. Hence, these transient species can be regarded as potential reporters for the binding of flurbiprofen to transport proteins. Specially, the triplets are extremely sensitive to the experienced microenvironment, thus they are particularly useful for this purpose.

In the model systems, where FBP is covalently bound to the amino acids Trp and Tyr, the first singlet excited state is highly sensitive to the intramolecular drug/amino acid interactions. The photophysical processes that take place in the FBP-Trp and FBP-Tyr dyads are of different nature. When the FBP-Trp systems are irradiated, the first singlet excited state of Trp is reached by direct absorption or by singlet-singlet energy transfer from $^1\text{FBP}^*$. The $^1\text{Trp}^*$ is quenched by a thermodynamically favoured electron transfer process. On the other hand, a minor, yet stereoselective deactivation of $^1\text{FBP}^*$ leads to radical ion pairs and/or exciplexes detectable by fluorescence spectroscopy. However, in the FBP-Tyr systems singlet-singlet energy transfer from FBP to Tyr is not observed, but a stereoselective quenching from the singlet excited state of the drug. These intramolecular deactivation

processes could occur by electron transfer (favoured in polar solvents) or exciplex/radical ion pairs formation (favoured in non-polar solvents). In general, no significant triplet excited state interactions are observed for these systems.

In the intermolecular drug/protein interactions (FBP or FBPM_e/SA), the triplet excited state of the drug is extremely sensitive to the interaction with the protein. Thus, it can be used as a probe to study the nature of the interactions taking place between FBP or FBPM_e and HSA or BSA.

Regression analysis of the decays obtained by LFP could allow to study the drug distribution among the bulk solution and the different protein binding sites.

In general, drug triplet lifetimes are considerably longer in the presence of protein, which can be due to a slower deactivation of the excited states inside the SA binding sites; in such pockets, a particular microenvironment is created, which is able to protect the triplet excited state from the attack by a second molecule of the drug, oxygen or other reagents. In some cases, an important triplet lifetime stereodifferentiation is observed when the drug remains inside the protein. On the other hand, triplet lifetimes and binding site occupancy are dependent on the nature of the protein (HSA or BSA).

Thus, the results obtained confirm that laser flash photolysis can be used to study the triplet excited state of FBP as a probe for the interactions with the binding sites of transport proteins, such as human or bovine serum albumins.

Resúmenes

Resumen en castellano

Las proteínas son macromoléculas muy abundantes en los organismos vivos. Cumplen con diversas funciones vitales, como por ejemplo transportar sustancias en el organismo, actuar como enzimas, etc. En concreto, la importancia de las proteínas transportadoras (como ASH y ASB) radica en que actúan como vehículo para la distribución de una amplia variedad de sustancias endógenas y exógenas en la sangre.

El estudio de la interacción fármaco/proteína es importante para conocer la biodistribución, el metabolismo, la eliminación y el efecto farmacológico del fármaco en el organismo. El número de técnicas utilizadas para la realización de este tipo de estudios es muy amplio y variado.

Con estos antecedentes, se propuso desarrollar una nueva metodología que proporcionase información relevante sobre el tipo de interacciones que tienen lugar entre el flurbiprofeno y las albúminas mencionadas. Para ello se hizo uso de las técnicas de fotólisis de destello láser y de fluorescencia. Se estudiaron las especies transitorias generadas tras absorción de luz, utilizándose las propiedades de los estados excitados del FBP como parámetros cuantitativos sensibles a las características del medio.

En primer lugar, se realizó la caracterización de los primeros estados excitados singlete y triplete del flurbiprofeno, identificándose sus principales procesos de desactivación. Además, se determinaron los tiempos de vida del primer estado excitado singlete y triplete, junto con los rendimientos cuánticos de los procesos fotofísicos implicados. Se pudo apreciar que especialmente el estado excitado triplete es altamente sensible al medio en el que se encuentra, lo que posibilita su

uso como parámetro cuantitativo para estudiar la interacción con ASH y ASB.

Conocidas las propiedades fotofísicas del fármaco, se procedió a estudiar una serie de sistemas modelo con el fin de simular el complejo no covalente que interviene en la situación real. En ellos, el FBP quedaba covalentemente unido a los aminoácidos del centro activo de la proteína más directamente implicados en la interacción con el fármaco. Así pues, se sintetizaron una serie de diadas entre el flurbiprofeno y los residuos de aminoácido triptófano y tirosina. Se observó que el estado excitado singlete fue altamente sensible a la interacción fármaco-aminoácido. En los sistemas FBP-Trp, prácticamente todos los fotones provenientes de la radiación incidente produjeron el primer estado excitado singlete del Trp, bien mediante absorción directa por este cromóforo o a través de transferencia de energía singlete-singlete desde el FBP. A continuación, tuvo lugar la desactivación intramolecular de $^1\text{Trp}^*$, probablemente por un proceso de transferencia electrónica. Por otra parte, la desactivación estereoselectiva desde $^1\text{FBP}^*$ condujo a la formación de exciplejos, detectados por fluorescencia. Finalmente, en los experimentos de FDL se observó el primer estado excitado triplete del FBP, generado bien por transferencia de energía triplete-triplete desde el $^3\text{Trp}^*$ o por retrotransferencia electrónica desde el par de iones radicalarios. En los sistemas FBP-Tyr, no se observó un proceso de transferencia de energía del FBP a la Tyr, sino una desactivación estereoselectiva desde el estado excitado singlete del fármaco. Esta desactivación, en medio polar, podría tener lugar bien por transferencia electrónica o por formación de exciplejo, mientras que en un medio apolar el proceso de desactivación implicaría formación de exciplejo.

Con el propósito de avanzar en el estudio de las interacciones fármaco/proteína, se procedió a estudiar sistemas donde ambos componentes se encontrasen en el mismo medio. Así pues, se llevaron a cabo estudios de sistemas intermoleculares FBPMe/AS y FBP/AS. En ellos, el primer estado excitado triplete resultó ser altamente sensible a la interacción con la proteína. Se observó que el tiempo de vida de triplete de FBPMe o de FBP aumenta considerablemente en presencia de proteína. Esto podía ser debido a la protección de este estado excitado frente al ataque por una segunda molécula de FBPMe o FBP, según el caso, o por ataque de oxígeno u otros reactivos.

En primer lugar, se escogió el sistema FBPMe/AS. El motivo por el cual se eligió el FBPMe fue por su mayor carácter hidrofóbico, que favorecería la inclusión en el interior de AS (preferentemente en el sitio I). El estudio se realizó con las formas enantioméricas (*S*)- y (*R*)-FBPMe con el fin de detectar una posible estereodiferenciación en la interacción. En el sistema FBPMe/ASH, se observó una importante estereodiferenciación en los tiempos de vida de triplete del FBPMe cuando se encontraba unido a la proteína. Además, se evidenció la existencia de una interacción estereoselectiva entre el FBPMe y ASH, observándose una mayor preferencia por el sitio I para el enantiómero (*S*)-. Por otra parte, la población de los sitios I y II de ASH y ASB por FBPMe se calculó por análisis de regresión de las cinéticas de desactivación del estado excitado triplete del FBPMe a distintas relaciones de concentración FBPMe/AS. Además, se demostró que el FBPMe interaccionaba preferentemente con ASH que con ASB.

Finalmente, se estudió el sistema FBP/AS, ya que el FBP es el fármaco que se suministra a los pacientes para el tratamiento de diversas dolencias. De nuevo, el análisis de regresión realizado a partir de las cinéticas de desactivación de los estados excitados triplete del

fármaco en presencia de proteína permitió conocer la distribución de éste en los dos sitios de unión de mayor afinidad de AS, así como la cantidad de fármaco libre en disolución. Además, la asignación de los sitios de unión I y II ocupados por el FBP fue confirmada por los experimentos realizados mediante desplazamiento del FBP usando sondas selectivas del sitio II de la albúmina (como (S)-ibuprofeno y ácido cáprico). Por otra parte, tanto los tiempos de vida de triplete como la ocupación de los sitios de unión dependieron del tipo de albúmina escogida (albúmina sérica humana o bovina). Finalmente, se encontró una pequeña estereoselectividad en la interacción del (S)- y (R)-FBP con ASB.

Resum en valencià

Les proteïnes són macromolècules molt abundants en els organismes vius. Complixen amb diverses funcions vitals, com per exemple transportar substàncies en l'organisme, actuar com a enzims, etc. En concret, la importància de les proteïnes transportadores (com ASH i ASB) radica que actuen com a vehicle per la distribució d'una àmplia varietat de substàncies endògenes i exògenes en la sang.

L'estudi de la interacció fàrmac/proteïna és important per a conèixer la biodistribució, el metabolisme, l'eliminació i l'efecte farmacològic del fàrmac en l'organisme. El nombre de tècniques utilitzades per a la realització d'este tipus d'estudis és molt ampli i variat.

Amb estos antecedents, es va proposar desenrotllar una nova metodologia que proporcionara informació rellevant sobre el tipus d'interaccions que tenen lloc entre el flurbiprofe i les albúmines mencionades. Per a això es va fer ús de les tècniques de fotòlisi de llampada làser i de fluorescència. Es van estudiar les espècies transitòries generades després de l'absorció de llum, utilitzant-se les propietats dels estats excitats del FBP com a paràmetres quantitius sensibles a les característiques del mig.

En primer lloc, es va realitzar la caracterització dels primers estats excitats singlet i triplet del flurbiprofe, identificant-se els seus principals processos de desactivació. A més, es van determinar els temps de vida del primer estat excitat singlet i triplet, junt amb els rendiments quàntics dels processos fotofísics implicats. Es va poder apreciar que especialment l'estat excitat triplet és altament sensible al mig en què es troba, la qual cosa possibilita el seu ús com a paràmetre quantitiu per a estudiar la interacció amb ASH i ASB.

Conegudes les propietats fotofísiques del fàrmac, es va procedir a estudiar una sèrie de sistemes model a fi de simular el complex no covalent que intervé en la situació real. En ells, el FBP quedava covalentment unit als aminoàcids del centre actiu de la proteïna més directament implicats en la interacció amb el fàrmac. Així, doncs, es van sintetitzar una sèrie de diades entre el flurbiprofe i els residus d'aminoàcid triptòfan i tirosina. Es va observar que l'estat excitat singlet fou altament sensible a la interacció fàrmac-aminoàcid. En els sistemes FBP-Trp, pràcticament tots els fotons provinents de la radiació incident van produir el primer estat excitat singlet del Trp, bé per mitjà d'absorció directa per este cromofor o a través de transferència d'energia singlet-singlet des del FBP. A continuació, va tindre lloc la desactivació intramolecular de $^1\text{Trp}^*$, probablement per un procés de transferència electrònica. D'altra banda, la desactivació estereoselectiva des de $^1\text{FBP}^*$ va conduir a la formació d'exciplexos, detectats per fluorescència. Finalment, en els experiments de FDL es va observar el primer estat excitat triplet del FBP, generat bé per transferència d'energia triplet-triplet des del $^3\text{Trp}^*$ o per retrotransferència electrònica des del parell d'ions radicalaris. En els sistemes FBP-Tyr, no es va observar un procés de transferència d'energia del FBP a la Tyr, sinó una desactivació estereoselectiva des de l'estat excitat singlet del fàrmac. Aquesta desactivació, al mig polar, podria tindre lloc bé per transferència electrònica o per formació d'exciplex, mentres que en un mitjà apolar el procés de desactivació implicaria formació d'exciplex.

Amb el propòsit d'avançar en l'estudi de les interaccions fàrmac/proteïna, es va procedir a estudiar sistemes on els dos components es trobaren en el mateix mig. Així, doncs, es van dur a terme estudis de sistemes intermoleculars FBPM_e/AS i FBP/AS. En ells, el primer estat excitat triplet va resultar ser altament sensible a la

interacció amb la proteïna. Es va observar que el temps de vida de triplet de FBPM_e o de FBP augmenta considerablement en presència de proteïna. Açò podia ser degut a la protecció d'aquest estat excitat enfront de l'atac per una segona molècula de FBPM_e o FBP, segons el cas, o per atac d'oxigen o altres reactius.

En primer lloc, es va triar el sistema FBPM_e/AS. El motiu pel qual es va triar el FBPM_e fou pel seu major caràcter hidrofòbic, que afavoriria la inclusió en l'interior d'AS (preferentment en el lloc I). L'estudi es va realitzar amb les formes enantiomèriques (*S*)- i (*R*)-FBPM_e a fi de detectar una possible estereodiferenciació en la interacció. En el sistema FBPM_e/ASH, es va observar una important estereodiferenciació en els temps de vida de triplet del FBPM_e quan es trobava unit a la proteïna. A més, es va evidenciar l'existència d'una interacció estereoselectiva entre el FBPM_e i ASH, observant-se una major preferència pel lloc I per a l'enantiòmer (*S*)-. D'altra banda, la població dels llocs I i II d'ASH i ASB per FBPM_e es va calcular per anàlisi de regressió de les cinètiques de desactivació de l'estat excitat triplet del FBPM_e a diferents relacions de concentració FBPM_e/AS. A més, es va demostrar que el FBPM_e interaccionava preferentment amb ASH que amb ASB.

Finalment, es va estudiar el sistema FBP/AS, ja que el FBP és el fàrmac que es subministra als pacients per al tractament de diverses malalties. De nou, l'anàlisi de regressió realitzat a partir de les cinètiques de desactivació dels estats excitats triplet del fàrmac en presència de proteïna, va permetre conèixer la distribució d'aquest en els dos llocs d'unió de major afinitat d'AS, així com la quantitat de fàrmac lliure en dissolució. A més, l'assignació dels llocs d'unió I i II ocupats pel FBP fou confirmada pels experiments realitzats per mitjà de desplaçament del FBP usant sondes selectives del lloc II de l'albumina (com (*S*)-ibuprofe i

àcid càpric). D'altra banda, tant els temps de vida de triplet com l'ocupació dels llocs d'unió van dependre del tipus d'albúmina triada (albúmina sèrica humana o bovina). Finalment, es va trobar una xicoteta estereoselectivitat en la interacció del (S)- i (R)-FBP amb ASB.

Summary

Proteins are macromolecules very abundant in the organism. Their main physiological functions are to act as a vehicle for different agents, to act as enzymes, etc. In particular, the importance of transport proteins (HSA and BSA) is to carry different endogenous and exogenous agents (including drugs) through the blood-stream.

Binding of drugs to SA in biological systems is a key process that can modulate a number of properties of the carried agent, such as increased solubility in plasma, decreased toxicity, protection against oxidation or prolongation of the *in vivo* half-life; hence, binding is essential for understanding biodistribution, metabolism, elimination or pharmacological effect of drugs in the body.

Several techniques have been used to investigate drug-protein binding processes. The aim of this work has been to develop alternative methodologies in order to get further insight into the relevant interactions taking place between flurbiprofen and the above mentioned serum albumins. For this purpose, the transient species generated by irradiation were used as probes to study the nature of these interactions, as their properties serve as quantitative parameters sensitive to the microenvironment. Thus, fluorescence and laser flash photolysis techniques were used.

First, the first excited states of flurbiprofen were fully characterised and the main processes leading to their deactivation were identified. The excited state lifetimes and the quantum yields of the involved photophysical processes have been determined, and found to be very sensitive to the medium. Specially, triplet excited state is highly sensitive to the microenvironment, which can be used as a reporter to study the interactions between the drug and HSA or BSA.

Next, several model dyads containing the FBP, Trp and Tyr chromophores were studied. This should give information about the operating mechanisms in the excited state interactions using chemically well-defined systems, where the non-covalent supramolecular drug-protein interactions are modeled by the analogous intramolecular processes in covalently linked dyads. Thus, different dyads were synthesised between the FBP pure enantiomers and tryptophan or tyrosine amino acid residues. The singlet excited state was highly sensitive to the drug-amino acid interaction. In FBP-Trp systems, most of the energy provided by the incident radiation at 266 nm reaches the $^1\text{Trp}^*$, either *via* direct absorption by this chromophore or by SSET from $^1\text{FBP}^*$. The main process observed is intramolecular $^1\text{Trp}^*$ quenching, that could take place by an electron transfer mechanism. On the other hand, a minor, yet stereoselective deactivation of $^1\text{FBP}^*$ leads to detectable exciplexes and/or radical ion pairs. Finally, the first triplet excited state of FBP can be reached by TTET from $^3\text{Trp}^*$ or by BET from the charge separated states. By contrast, in FBP-Tyr systems a SSET process from $^1\text{FBP}^*$ to $^1\text{Tyr}^*$ is not observed, but instead stereoselective quenching of the singlet excited state of the drug takes place. In polar solvents this quenching is favoured either *via* electron transfer or exciplex formation, while in non-polar solvents, only exciplex formation is allowed.

For further progress in the understanding of drug/protein interactions intermolecular FBPMe/SA and FBP/SA systems were studied. In these cases, the first triplet excited state of the drug was highly sensitive to the interaction with the protein. Triplet lifetimes of FBPMe and FBP were longer in the presence of protein. This can be attributed to a slower deactivation of the excited states inside the SA binding sites, where an exceptional microenvironment protecting the

triplet excited state from attack by a second drug molecule, oxygen or other reagents is provided. First, FBPMe/SA system was studied. The choice of FBPMe was done for experimental convenience, since its hydrophobic character should favour inclusion within SA (preferentially in site I). Both (*R*)- and (*S*)-FBPMe have been investigated in order to obtain valuable information about the possible stereodifferentiation in the interaction with proteins. Regression analysis of the decay kinetics of the transient absorption spectra corresponding to the triplet-triplet absorption provided precise information on the number of binding sites and their degree of occupancy. In FBPMe/HSA system, a remarkable stereodifferentiation in the triplet lifetimes of FBPMe within the protein was observed. For the same FBPMe/HSA ratio, inclusion within HSA is slightly favored for the (*S*)- isomer. Besides, a significant stereodifferentiation was observed when comparing the occupation level of the two sites, with higher preference for site I in the case of (*S*)-FBPMe. In general, when the FBPMe/SA ratio was low (far from saturation) all the drug was protein-bound and the high affinity site I was selectively populated. Progressive increase of the FBPMe/SA ratio resulted in saturation of site I and (subsequently) site II. This led to a decrease of site selectivity and the appearance of increasing amounts of free FBPMe. Finally, it was demonstrated that FBPMe preferably interacts to HSA than to BSA.

The last problems studied were the FBP/SA interactions, because FBP is the real drug prescribed for the treatment of several diseases. Again, regression analysis of the triplet decay kinetics provided information on the number of binding sites and their degree of occupancy. Moreover, the assignment of FBP bound in site I and site II in SA was confirmed by displacement of the drug by selective site II probes, as (*S*)-ibuprofen and capric acid. On the other hand, the triplet

lifetimes and the degree of occupancy of both sites were dependent on the nature of the albumin. Finally, a slight stereodifferentiation in the interaction of (*S*)- or (*R*)-FBP with BSA was observed.

***ANEXO I. Técnicas fotofísicas: fluorescencia y fotólisis
de destello láser***

Ante la necesidad de conocer el mecanismo por el que transcurre un proceso químico, uno de los recursos más utilizados es el de intentar detectar o atrapar los intermedios de reacción que se generan. Cuando este proceso implica la formación de especies transitorias generadas por acción de la radiación, las técnicas espectroscópicas resueltas en el tiempo son de gran utilidad para la detección de estas especies, bien por su emisión (fluorescencia) o absorción en las regiones UV-vis-IR (fotólisis de destello láser).

AI.1. Fluorescencia

La fluorescencia es una técnica espectroscópica muy sensible (límites de detección del orden de partes por billón) capaz de detectar especies transitorias de moléculas que pueden absorber radiación electromagnética. Es una técnica muy útil para elucidar el mecanismo de fotodegradación de fármacos. Ofrece la posibilidad de medir espectros de fluorescencia en estado estacionario y resuelto en el tiempo, dando información sobre la evolución del estado excitado de la molécula bajo estudio. Las especies transitorias que permite detectar son los estados excitados singlete

Un espectrómetro de fluorescencia consta de una lámpara de excitación, que puede ser de Xenón o Mercurio, la cual genera un haz que atraviesa la muestra. Se puede seleccionar la longitud de onda de excitación gracias a la existencia de un monocromador. La muestra, tras ser excitada, emite luz en todas las direcciones, pero se registra la emisión perpendicular al haz de excitación, para evitar la monitorización de posibles interferencias derivadas de este haz. Finalmente, la señal llega a un fotomultiplicador, y de ahí se monitoriza a la pantalla del ordenador. Si se desea registrar espectros de excitación, también puede

fijarse la longitud de onda de emisión, gracias a la existencia de un segundo monocromador de emisión.

En la Figura Al.1 se muestra de forma esquemática un espectrómetro de fluorescencia.

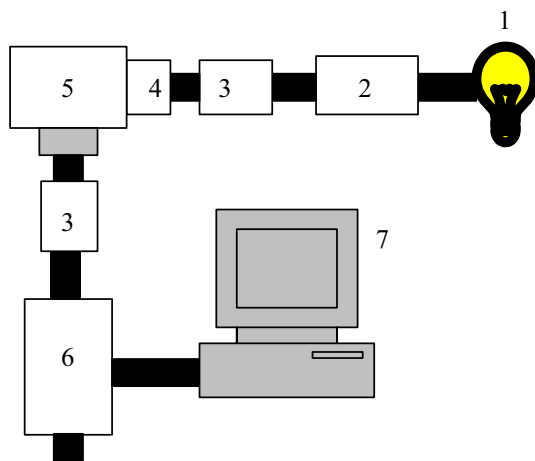


Figura Al.1. Esquema de un espectrómetro de fluorescencia: 1. Lámpara de excitación, 2. Monocromador de excitación, 3. Polarizador, 4. Contador de fotones, 5. Cámara para la muestra, 6. Monocromador de emisión, 7. Ordenador.

AI.2. Fotólisis de destello láser (FDL)

La técnica de fotólisis de destello láser es una técnica de absorción resuelta en el tiempo, que consiste en la generación de especies excitadas mediante un *haz excitador* (láser pulsado de elevada intensidad) y en registrar la absorción de éstas mediante un *haz analizador*, en la región UV-vis con resolución temporal. En la Figura AI.2 se muestra de forma esquemática un sistema de FDL.

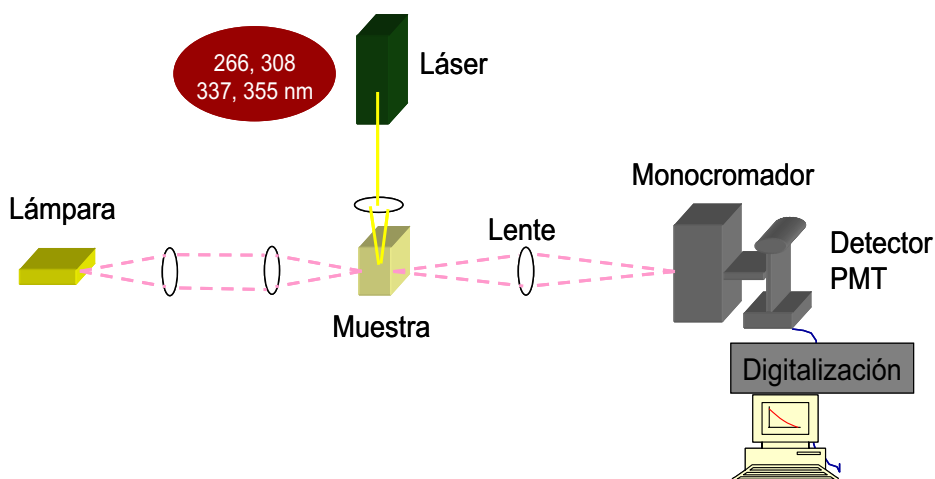


Figura AI.2. Esquema de un sistema de FDL.

Los componentes de un sistema de FDL son los siguientes:

- Haz excitador: láser pulsado, que puede ser de XeF, Nd, etc. En este caso se utilizó un sistema láser pulsado de Nd-YAG (Quantel Brilliant, de 266 ó 355 nm).

- Haz analizador: se pueden utilizar distintos tipos de fuentes de radiación, como infrarrojo, UV-vis, etc, aunque el más común es el de UV-vis. En este caso se utilizó un detector UV-vis (lámpara de Xe).

- Sistema de detección: consta de un monocromador, con el que se puede seleccionar la longitud de onda deseada, y un fotomultiplicador, que detecta la señal a la longitud de onda deseada. De esta forma, el sistema es capaz de detectar la señal en función del tiempo y la longitud de onda seleccionada.

- Sistema de análisis de la señal: formado por un osciloscopio, que permite representar gráficamente la señal de voltaje en función del tiempo que llega al fotomultiplicador. El osciloscopio está conectado a un ordenador para el posterior almacenamiento y tratamiento de datos.

Aunque el sistema de fotólisis es un espectrofotómetro de un solo haz, se comporta como si fuese de doble haz, donde el de referencia y el de muestra se encuentran separados en el tiempo en lugar del espacio. Así pues, la señal que se observa tras FDL viene dada por la absorción de la muestra antes y después de ser irradiada con el pulso de láser. Ese cambio de absorción (ΔDO) viene dado por la ecuación A.1.

$$\Delta DO = -\log(I_0 / I_t) \quad (A.1)$$

donde I_0 es la intensidad del haz incidente antes de atravesar la muestra y I_t es la intensidad del haz tras atravesar la muestra. La medida de ΔDO en función del tiempo proporciona una traza que suele seguir una desactivación exponencial. El caso más sencillo se da cuando existe una única especie transitoria que se desactiva, bien de forma no radiante o por colisiones con el disolvente. En este caso, la señal obtenida sigue una ley de tipo monoexponencial, según la ecuación A.2.

$$\Delta DO = Ae^{(-k_D \cdot t)} \quad (A.2)$$

donde ΔDO es el cambio de absorbancia de la muestra, A es el factor preexponencial, t es el tiempo y k_D es la constante de desactivación de la especie transitoria, que también se puede expresar como $k_D = 1/\tau$, donde τ es el tiempo de vida de la especie transitoria.

La técnica de FDL permite estudiar tanto la desactivación cinética de la especie transitoria generada como la formación de nuevas especies. También se puede construir el espectro de absorción UV-vis de la especie transitoria generada, analizando las trazas resueltas en el tiempo a distintos valores de longitud de onda. El espectro obtenido resulta de la diferencia de la absorptividad molar de la muestra en el estado fundamental y de la especie transitoria formada después de la excitación. Este espectro es característico de aquellas longitudes de onda donde el estado fundamental es transparente.

El tipo de especies transitorias que se pueden detectar con esta técnica son estados excitados tripletes, radicales, radicales aniones o radicales cationes.

La técnica de FDL es muy útil para poder dilucidar mecanismos de reacción por el estudio de la evolución cinética de las especies transitorias formadas después de la excitación por láser.

ANEXO II. Contribución a congresos

- 1.- I. Vayá, M. C. Jiménez, M. A. Miranda, R. Tormos.
“Estudios fotoquímicos y fotofísicos de bicromóforos diastereoméricos ketoprofeno/estireno y naproxeno/estireno”. I JORNADAS IBÉRICAS DE FOTOQUÍMICA. Septiembre **2003**; Santiago de Compostela (España). Comunicación póster.

- 2.- I. Vayá, M. C. Jiménez, M. A. Miranda.
“Sistemas bicromofóricos modelo para el estudio de interacciones fármaco-diana”. 13^{EMES} JOURNEES FRANCO-ESPAGNOLES DE CHEMIE ORGANIQUE (JFECO XIII). Mayo **2004**; Carry-Le-Rouet (Francia). Comunicación oral.

- 3.- M. C. Jiménez, I. Vayá, M. A. Miranda, R. Tormos.
“Characterization of the lowest singlet and triplet states of (S)-flurbiprofen”. XX IUPAC SYMPOSIUM ON PHOTOCHEMISTRY. Julio **2004**; Granada (España). Comunicación póster.

- 4.- I. Vayá, M. C. Jiménez, M. A. Miranda.
“Triplet excited states as chiral reporters for the binding sites of drugs to transport proteins”. VII CONGRESO DE FOTOQUÍMICA. Junio **2005**; La Rioja (España). Comunicación póster.

- 5.- M. C. Jiménez, I. Vayá, M. A. Miranda.
“Photophysical techniques for the study of drug-protein interactions: flurbiprofen-human serum albumin as model system”. 11TH CONGRESS OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR PHOTOBIOLOGY. Septiembre **2005**; Aix-Les-Bains (Francia). Comunicación póster.

6.- S. Abad, I. Vayá, U. Pischel, M. C. Jiménez, M. A. Miranda.
“*Diastereodifferentiation in the formation and decay of singlet excimers upon excitation of naphthalene dyads*”. XXI IUPAC SYMPOSIUM ON PHOTOCHEMISTRY. Abril **2006**; Kyoto (Japón). Comunicación póster.

7.- C. J. Bueno, I. Vayá, M. C. Jiménez, M. A. Miranda.
“*Use of triplet excited states for the study of drug binding to human and bovine serum albumins*”. III REUNIÓN DE QUÍMICA ORGÁNICA DEL MEDITERRÁNEO. Octubre **2006**; Castellón (España). Comunicación póster.

8.- I. Vayá, M. C. Jiménez, M. A. Miranda.
“*Excited state interactions in flurbiprofen-tryptophan dyads*”. XXIII INTERNATIONAL CONFERENCE ON PHOTOCHEMISTRY. Julio **2007**; Colonia (Alemania). Comunicación poster.

9.- M. C. Jiménez, I. Vayá, M. A. Miranda.
“*Triplet Excited States as Reporters for the Binding of Drugs to Serum Albumins. Competition Studies on Human vs. Bovine Protein Occupancy*”. XXIII INTERNATIONAL CONFERENCE ON PHOTOCHEMISTRY. Julio **2007**; Colonia (Alemania). Comunicación poster.

10.- M. C. Jiménez, I. Vayá, V. Lhiaubet-Vallet, M. A. Miranda.
“*The excited singlet state of flurbiprofen and carprofen within the binding sites of human and bovine serum albumins*”. II JORNADAS IBÉRICAS DE FOTOQUÍMICA. Julio **2007**; Faro (Portugal). Comunicación póster.

11.- C. J. Bueno, I. Vayá, M. C. Jiménez, M. A. Miranda.

“Laser flash photolysis for the study of flurbiprofen binding to human and bovine serum albumins”. II JORNADAS IBÉRICAS DE FOTOQUÍMICA.

Julio **2007**; Faro (Portugal). Comunicación póster.

ANEXO III. Publicaciones

- 1.- M. C. Jiménez, M. A. Miranda, R. Tormos, I. Vayá.
“Characterisation of the Lowest Singlet and Triplet Excited States of (S)-Flurbiprofen”. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, 3, 1038.
- 2.- M. C. Jiménez, M. A. Miranda, I. Vayá.
“Triplet Excited States as Chiral Reporters for the Binding of Drugs to Transport Proteins”. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10134.
- 3.- I. Vayá, C. J. Bueno, M. C. Jiménez, M. A. Miranda.
“Use of Triplet Excited States for the Study of Drug Binding to Human and Bovine Serum Albumins”. *ChemMedChem.* **2006**, 1, 1015.
- 4.- I. Vayá, M. C. Jiménez, M. A. Miranda.
“Excited State Interactions in Flurbiprofen-Tryptophan Dyads”. *J. Phys. Chem. B.* **2007**, 111, 9363.
- 5.- I. Vayá, M. C. Jiménez, M. A. Miranda.
“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. Enviado.*

Otras publicaciones relacionadas

- 6.- I. Vayá, M. C. Jiménez, M. A. Miranda.
“Stereodifferentiation in the Fluorescence of Naproxen-Arginine Salts in the Solid States”. *Tetrahedron Asymmetry.* **2005**, 16, 2167.

7.- S. Abad, I. Vayá, M. C. Jiménez, U. Pischel, M. A. Miranda.
“Diastereodifferentiation of Novel Naphthalene Dyads by Fluorescence Quenching and Excimer Formation”. *ChemPhysChem*. **2006**, 7, 2175.

Characterisation of the lowest singlet and triplet excited states of *S*-flurbiprofen

M. Consuelo Jiménez, Miguel A. Miranda,* Rosa Tormos and Ignacio Vayá
Departamento de Química-Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC, Universidad
Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, Apdo 22012, 46071, Valencia, Spain

Received 7th June 2004, Accepted 15th October 2004
First published as an Advance Article on the web 8th November 2004

The photophysical properties of *S*-flurbiprofen [*S*-2-fluoro- α -methyl-4-biphenylacetic acid], a nonsteroidal anti-inflammatory drug, have been examined using steady-state and time-resolved spectroscopic techniques. The energy of its first singlet excited state is 99 kcal mol⁻¹. The fluorescence quantum yields and lifetimes (at 300 nm) have been determined in acetonitrile, methanol, hexane and PBS; they are in the range 0.15 < ϕ_f < 0.33 and 0.7 < τ_f < 2.0 ns. The intersystem crossing quantum yields are between 0.45 and 0.71; the λ_{max} of the T–T absorption is 360 nm, and the triplets live from 15 to 106 μ s. Steady state photolysis in aqueous medium leads to *S*-2-hydroxy- α -methyl-4-biphenylacetic acid *via* phototransfer of energy to water, in addition to the photodecarboxylation products observed in organic solvents.

Introduction

S-Flurbiprofen [*S*-2-fluoro- α -methyl-4-biphenylacetic acid] (Chart 1) is a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID). It has been widely used for several medical purposes, such as treatment of inflammation and pain caused by rheumatoid arthritis,¹ osteoarthritis² and soft tissue injuries (tendinitis and bursitis),³ prevention of migraine headache,⁴ treatment of sunburn⁵ and acute gout⁶ or pain control after excimer laser photorefractive keratectomy.⁷

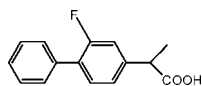


Chart 1

The pharmacological effects of *S*-flurbiprofen (FBP) are associated with inhibition of prostaglandin H₂ synthase (also named cyclooxygenase or COX), which exists in two isoforms (COX-1 and COX-2) and is the enzyme responsible for the catalytic conversion of arachidonic acid into prostaglandin H₂, a key intermediate in the biosynthetic pathway of prostaglandins, prostacyclins and thromboxanes.⁸

S-Flurbiprofen has been used as a probe to displace fluorescent cyclooxygenase inhibitors from the active sites; emission variations provide valuable information on the interactions of such inhibitors with COX-1 and COX-2.⁹ Moreover, the intrinsic fluorescence of FBP has been shown to be a useful tool for the study of the interaction between the drug and human serum albumin, as well as for the characterisation of the binding sites.¹⁰ This is an important issue, as formation of non-covalent complexes with proteins is a key process in the transport and biodistribution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in treated patients.

In this context, although the photophysical properties of a number of anti-inflammatory 2-arylpropionic acids (*i.e.* naproxen, benoxaprofen, carprofen, ketoprofen, tiaprofenic acid and suprofen) have been previously described,¹¹ the first singlet excited state of FBP has not yet been fully characterised. Besides, there is no report on the lowest lying FBP triplet, in spite of its potential interest as a reporter of the physicochemical properties of its environment when complexed with biomolecules. A detailed investigation on the photophysical properties of FBP

would also be helpful to understand its photoreactivity, which involves initial cleavage of the C–C bond α to the carbonyl group, ultimately leading to decarboxylation products.¹²

In the present paper, the lowest singlet and triplet excited states of *S*-flurbiprofen have been examined, using both steady-state and time resolved spectroscopic techniques.

Experimental

Materials and solvents

S-Flurbiprofen, benzophenone, acetophenone, chloranil, biacetyl and 1,3-cyclohexadiene were purchased from Aldrich. Their purity was checked by ¹H NMR and HPLC analysis.

The reagent grade solvents (methanol, hexane or acetonitrile) were obtained from Scharlau and used without further purification. Solutions of PBS 0.01 M (pH = 7.4) were prepared by dissolving Sigma phosphate buffered saline tablets in deionized water.

Absorption spectra

Optical spectra in different solvents were measured on a Perkin Elmer Lambda 35 UV/Vis spectrometer.

Fluorescence measurements

Emission spectra were recorded on an Edinburgh FS900 spectrofluorimeter system, provided with an M300 monochromator in the wavelength range 200–900 nm. The samples were placed into 10 × 10 mm² Suprasil quartz cells with a septum cap. The solutions were purged with nitrogen or oxygen for at least 15 min before the measurements. Fluorescence quantum yields were determined using β -methylstyrene as reference ($\phi_f = 0.35$ at 281 nm and 0.30 at 254 nm in hexane).¹³ The absorbance of the samples at the excitation wavelength was kept below 0.1. Excitations and emission slits were maintained unchanged during the emission experiments. For time resolved fluorescence decay measurements, the conventional single photon counting technique was used.

Laser flash photolysis experiments

Laser flash photolysis experiments were performed by using a Q-switched Nd:YAG laser (Quantel Brilliant, 266 or 355 nm for photosensitized experiments, 4 mJ per pulse, 5 ns fwhm) coupled

to a mLFP-111 Luzchem miniaturized equipment. All transient spectra were recorded employing $10 \times 10 \text{ mm}^2$ quartz cells with 4 mL capacity and were bubbled during 30 min with N_2 , air or O_2 before acquisition. The absorbance of the samples was kept between 0.20 and 0.25 at the laser wavelength.

All the experiments were carried out at room temperature (22°C).

General irradiation procedure

Solutions of FBP (5 mM) in hexane, acetonitrile, methanol or PBS were irradiated for 16 h through quartz, inside a Luzchem multilamp photoreactor, with the light from four 8W lamps emitting mainly at 254 nm. The course of the reaction was followed by GC, GC-MS and ^1H NMR; the degrees of conversion, the product distributions and the mass balances were determined using adequate standards. Photoreaction quantum yields were determined using phenylglyoxylic acid as actinometer.¹⁴

Results and discussion

Fluorescence characteristics of *S*-flurbiprofen

Fig. 1 shows the fluorescence spectrum of *S*-flurbiprofen in PBS, when excited at 254 nm. The excitation spectrum for the emission at 300 nm is also shown in the figure. From the intersection between the two bands, after normalisation, a singlet energy of 99 kcal mol^{-1} was obtained.

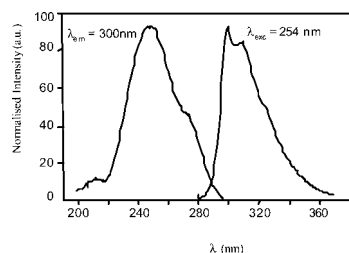


Fig. 1 Normalised excitation and emission spectra of *S*-flurbiprofen in PBS.

No major changes in the shape of the peaks or in the position of the absorption maxima were observed when methanol, hexane or acetonitrile were employed as solvents. Likewise, changing the excitation wavelength from 254 to 281 nm did not result in significant variations. Fluorescence quantum yields and lifetimes under different conditions are reported in Table 1.

The fluorescence of FBP was sensitive to the presence of oxygen. Thus, when the samples were purged with O_2 a significant decrease of the quantum yields and the lifetimes was observed; for instance, in acetonitrile solution (excitation at 281 nm) these values were found to be $\phi_f = 0.15$ and $\tau_f = 1 \text{ ns}$.

Table 1 Photophysical properties of *S*-flurbiprofen in deaerated media

Solvent	ϕ_f^a	τ_f/ns	k_f/s^{-1}	ϕ_{ISC}	$\tau_T/\mu\text{s}$	$k_{\text{ISC}}/\text{s}^{-1}$	$k_{\text{NR}}/\text{s}^{-1}$
MeCN	0.20 (0.22)	1.7	1.2×10^8	0.71	31	4.2×10^8	4.1×10^7
MeOH	0.27 (0.27)	1.5	1.8×10^8	0.70	33	4.7×10^8	2.0×10^7
C_6H_{14}	0.32 (0.33)	2.0	1.6×10^8	0.65	15	3.3×10^8	1.0×10^7
PBS	0.15 (0.15)	0.7	2.1×10^8	0.45	106	6.4×10^8	5.0×10^8

^a The data have been obtained upon excitation at 254 or 281 nm (in brackets).

Laser flash photolysis measurements

Fig. 2 shows the transient absorption spectra of *S*-flurbiprofen ($2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$) in PBS after 266 nm laser excitation. The band with maximum at 360 nm was assigned to the T–T absorption of FBP and, as expected for a triplet, it was quenched by oxygen.

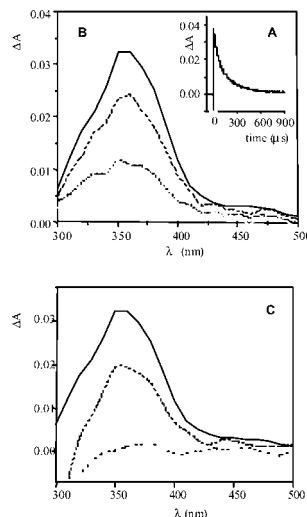


Fig. 2 Laser flash photolysis (266 nm excitation) of *S*-flurbiprofen $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ in PBS. (A) Transient decay monitored at 360 nm, under N_2 . (B) Spectra recorded under the same conditions, 14.4 (—), 100 (---) and 310 μs (.....) after the laser pulse. (C) Comparison between the spectra generated under N_2 , air and O_2 .

The triplet lifetimes in deaerated media were found to be between 15 and 106 μs , depending on the solvent (see Table 1). The highest value was found in neutral aqueous buffer. The table also shows the intersystem crossing quantum yields that ranged between 0.45 and 0.71; they were calculated by the comparative method, based on energy transfer from known donors. The triplet lifetimes did not depend on the laser intensity (between 4 and 20 mJ pulse^{-1}), ruling out a possible annihilation process. However, they decreased with increasing FBP concentration; the self-quenching constant in MeCN is given in Table 2.

The T–T transient absorption of *S*-flurbiprofen was also generated by photosensitisation with benzophenone (BZP) and acetophenone. Thus, laser flash photolysis of BZP at 355 nm produced the typical BZP triplet with maximum at *ca.* 525 nm. In the presence of FBP, a fast disappearance of this band was observed, concomitantly with the growth of the 360 nm band, characteristic of FBP triplet (see Fig. 3). The rate constant of this energy transfer process was found to be $6.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ in MeCN at room temperature. The molar absorption coefficient

Table 2 Reactivity of *S*-flurbiprofen triplet in MeCN

Substrate	$k_q/M^{-1} s^{-1}$
Self-quenching	5.7×10^8
O ₂	8.2×10^8
1,3-Cyclohexadiene	1.0×10^{10}
Chloranil ^a	9.0×10^9
Biacetyl	5.0×10^9

^a Absorption from both the chloranil triplet and its radical cation were observed.

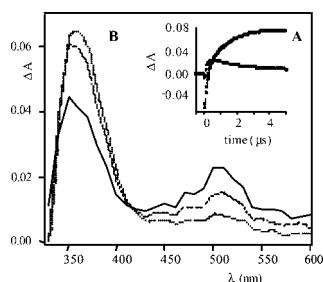


Fig. 3 (A) Growth and decay profiles monitored at 360 and 520 nm upon 355 nm laser flash photolysis of benzophenone (2×10^{-3} M) in the presence of *S*-flurbiprofen (5×10^{-4} M) under N₂-saturated conditions. (B) Spectra of the transient intermediates generated 4 (—), 5.3 (---) and 8.5 μs (·····) after the laser pulse.

of flurbiprofen triplet was determined using benzophenone as standard and assuming a value of $7800 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 525 nm for this compound.¹⁵ In MeCN, it was found to be $32000 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 360 nm.

The ISC quantum yields of *S*-flurbiprofen in different solvents were calculated from the ΔA of the T–T bands of isoabsorptive solutions of BZP and FBP, the molar absorption coefficients of their triplets in acetonitrile (see above) and the known ISC quantum yield of BZP (*ca.* 1); they are shown in Table 1. From the values of ϕ_T , τ_T and ϕ_{ISC} , it was possible to determine the rate constant of the different photophysical processes (k_T , k_{ISC} and k_{NR}); they are also included in Table 1.

Thus, the energy of the lowest triplet excited state of FBP must be lower than 69 kcal mol^{-1} (the triplet energy of BZP).¹⁶ In order to obtain a narrower range for this parameter, different triplet quenchers (*i.e.* 1,3-cyclohexadiene, chloranil, and biacetyl) were used, and their interaction with the T–T absorption band was studied; the rate constants for these processes are given in Table 2.

The above data indicate that, as expected for a biphenyl derivative, the triplet energy of FBP must be close to 65 kcal mol^{-1} . Actually, triplet–triplet energy transfer to all the acceptors in Table 2 (E_T between 50 and 57 kcal mol^{-1}) would be thermodynamically favoured.

Product studies

When FBP was irradiated in different solvents, in the presence of oxygen, four products were detected in the photoreaction mixtures (see Chart 2 and Table 3). In general, the photoreaction quantum yields were low (0.03 in PBS and <0.005 in the organic solvents).

The results obtained in the three organic solvents were in good agreement with the previously reported photochemical behaviour of FBP in methanol.¹² However, formation of phenol 4⁷ in aqueous solution was unexpected. Clearly, this photoproduct must arise *via* photonucleophilic aromatic substitution. A

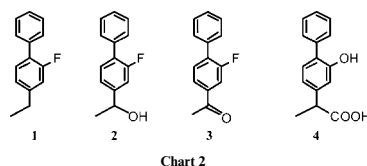


Chart 2

Table 3 Photochemistry of FBP at 254 nm

Solvent	Conversion (%)	1	2	3	4
MeCN	71	—	3	97	—
MeOH	33	—	13	87	—
C ₆ H ₁₄	65	—	25	75	—
PBS	100	50	—	23	27

simplified reaction scheme is shown in Fig. 4. Similar processes have been described for other fluoroaromatics, including fluoroquinolone antibiotics.¹⁸ In general, deaeration of the irradiated solutions did not result in an enhanced photodegradation efficiency; this points to the first excited singlet as the reactive state. Accordingly, triplet sensitisation with benzophenone derivatives did not lead to significant amounts of products. Further support in favour of photoreaction from the excited singlet was provided by comparing the photophysical and the photochemical data. It is specially noteworthy that the fluorescence quantum yields and lifetimes, as well as the efficiency of intersystem crossing, were lower in aqueous media, where the photoreaction was faster and gave rise to photosubstitution as well as photodecarboxylation products.

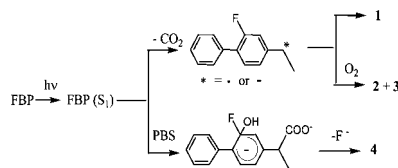


Fig. 4 Mechanistic rationalisation for the formation of the FBP photoproducts.

Conclusions

In summary, the first excited singlet and triplet states of *S*-flurbiprofen have been fully characterised, and the main processes leading to their deactivation have been identified. The excited state lifetimes and the quantum yields of the involved photophysical processes have been determined. Finally, steady state photolysis in aqueous medium has provided evidence for photonucleophilic aromatic substitution as an important photochemical pathway, in addition to the photodecarboxylation previously observed in organic solvents.

When the photophysical behaviour of FBP is compared with that of biphenyl (BP, the parent chromophore), a number of properties are closely similar. They include the singlet and triplet energies (95 – 100 and 65 – 70 kcal mol^{-1} , respectively), the position of the fluorescence band (λ_{max} *ca.* 300 nm) and the T–T absorption maxima ($\lambda_{\text{max}} = 360 \text{ nm}$). The quantum yields of fluorescence and intersystem crossing of BP are known to be 0.15 and 0.84, respectively.¹⁶ This is in reasonable agreement with the values obtained for FBP (Table 1). However, the main differences between FBP and BP were the singlet and triplet lifetimes, which were found to be $\tau_T = 15 \text{ ns}$ and $\tau_T = 130 \mu\text{s}$ for the latter.¹⁶ The values determined for FBP (Table 1) were clearly shorter, probably due to excited state deactivation

via hydrogen bonding interactions involving the carboxylic group. As regards the comparison with related NSAIDs, FBP shares with naproxen (NPX) and carprofen (CP) the ability to generate detectable singlet and triplet excited species. By contrast, ketoprofen (KP), tiaprofenic acid (TPA) and suprofen (SP) do not exhibit reasonable fluorescence, owing to a very efficient intersystem crossing. On the other hand, FBP (as NPX and CP) decarboxylates from its singlet excited state with low quantum yield (< 0.01), while in the case of KP, TPA and SUP decarboxylation occurs from the triplet excited state much more efficiently ($\phi_{DEC} > 0.4$). Finally, FBP and CP undergo dehalogenation as an additional photoreaction pathway.

As a general conclusion, the results obtained for FBP in the present work suggest that the singlet and triplet excited states of FBP can be used as reporters to gain insight into the nature of the binding sites of NSAIDs to receptors and transport proteins. The careful characterisation of both species and their medium/dependent properties provide the basis for future investigations in this field.

Acknowledgements

Financial support from the MCYT (BQU2001-2725), the Generalitat Valenciana (Grupos03/82 and GV04B/468) and the U.P.V. (Project 2003-0522) is gratefully acknowledged. I. V. thanks 'Fundación José y Ana Royo' for a fellowship.

References

- (a) J. Rovinsky and D. Micekova, Six-month prospective study to monitor the treatment of rheumatic diseases with sustained-release flurbiprofen, *Drug Exp. Clin. Res.*, 2000, **26**, 19–24; (b) P. J. Andrusis, Jr. and J. Peter, Treatment of rheumatoid arthritis with thalidomide alone or in combination with other anti-inflammatory agents, *PCT Int. Appl.*, 1995, 15 pp., CODEN: PIXXD2 WO 9504533 A2 19950216 CAN 122:222880 AN 1995:468706; (c) W. F. Kean, E. J. Antal, E. M. Grace, H. Cauvier, J. Rischke and W. W. Buchanan, The pharmacokinetics of flurbiprofen in younger and elderly patients with rheumatoid arthritis, *J. Clin. Pharmacol.*, 1992, **32**, 41–48; (d) S. J. Preston, M. H. Arnold, E. M. Beller, P. M. Brooks and W. W. Buchanan, Variability in response to nonsteroidal anti-inflammatory analgesics: evidence from controlled clinical therapeutic trial of flurbiprofen in rheumatoid arthritis, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1988, **26**, 759–764; (e) J. Bass, B. Athreya, N. Brandstrup, E. Brewer, M. Di Ianni, D. Goldsmith, R. Hollister, D. Kredich and J. Miller, Flurbiprofen in the treatment of juvenile rheumatoid arthritis, *J. Rheumatol.*, 1986, **13**, 1081–1083.
- (a) N. P. Misra, A comparative study of flurbiprofen and piroxicam in osteoarthritis, *J. Postgrad. Med.*, 1992, **38**, 164–166; (b) N. Bellamy, W. G. Bensen, P. M. Ford, S. H. Huang and J. Y. Lang, Double-blind randomized controlled trial of flurbiprofen-SR (ANSAID-SR) and diclofenac sodium-SR (Voltaren-SR) in the treatment of osteoarthritis, *Clin. Invest. Med.*, 1992, **15**, 427–433; (c) J. Stamp, V. Rhind and I. Haslock, A comparison of nefopam and flurbiprofen in the treatment of osteoarthritis, *Br. J. Clin. Pract.*, 1989, **43**, 24–26.
- (a) R. A. Moore, M. R. Tramer, D. Carroll, P. J. Wiffen and H. J. Mcquay, Quantitative systematic review of topically applied non-steroidal anti-inflammatory drugs, *Br. Med. J.*, 1998, **316**, 333–338; (b) D. S. Muckle, Flurbiprofen for the treatment of soft tissue trauma, *Am. J. Med.*, 1986, **80**, 76–80; (c) D. S. Muckle, A comparative study of flurbiprofen and aspirin in soft tissue trauma, *Br. J. Sports Med.*, 1976, **10**, 11–13; (d) H. R. Mena, P. L. Lomen, L. F. Turner and K. R. Lamborn, E. L. Brinn, Treatment of acute shoulder syndrome with flurbiprofen, *Am. J. Med.*, 1986, **80**, 141–144.
- (a) G. D. Solomon and R. S. Kunkel, Flurbiprofen in the prophylaxis of migraine, *Cleveland Clin. J. Med.*, 1993, **60**, 43–48; (b) G. Lagrue, J. Laurent and J. J. Thebault, Efficacy of flurbiprofen in migraine attacks?, *Presse Med.*, 1983, **12**, 901.
- (a) A. Sunshine and E. M. Laska, Prevention or treatment of sunburn using S(+)-flurbiprofen, *PCT Int. Appl.*, 1991, 46 pp., CODEN: PIXXD2 WO 9117740 A1 19911128 CAN 116:46072 AN 1992:46072; (b) P. Tan, F. P. Flowers, O. E. Araujo and P. Doering, Effect of topically applied flurbiprofen on ultraviolet-induced erythema, *Drug Intel. Clin. Pharm.*, 1986, **20**, 496–499.
- (a) P. L. Lomen, L. F. Turner, K. R. Lamborn, M. A. Winblad, R. L. Sack and E. L. Brinn, Flurbiprofen in the treatment of acute gout. A comparison with indomethacin, *Am. J. Med.*, 1986, **80**, 134–139; (b) R. C. Butler, D. H. Goddard, C. S. Higgins, P. Hollingworth, C. T. Pease, M. A. Stodell and J. T. Scott, Double-blind trial of flurbiprofen and phenylbutazone in acute gouty arthritis, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1985, **20**, 511–513.
- (a) M. Vetrugno, A. Maino, G. M. Quaranta and L. Cardia, A randomized, double-masked, clinical study of the efficacy of four nonsteroidal anti-inflammatory drugs in pain control after excimer laser photorefractive keratectomy, *Clin. Ther.*, 2000, **22**, 719–731; (b) A. Appiotti, L. Gualdi, M. Alberti and M. Gualdi, Comparative study of the analgesic efficacy of flurbiprofen and diclofenac in patients following excimer laser photorefractive keratectomy, *Clin. Ther.*, 1998, **20**, 913–920.
- (a) C. I. Bayly, W. C. Black, S. Léger, N. Ouimet, M. Ouellet and M. D. Percival, Structure-based design of COX-2 selectivity into flurbiprofen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, **9**, 307–312; (b) T. Smith, J. McCrackens, Y.-K. Shin and D. DeWitt, Arachidonic acid and nonsteroidal anti-inflammatory drugs induced conformational changes in the human prostaglandin endoperoxide H synthase-2 (cyclooxygenase-2), *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 40407–40415; (c) C. I. Bayly, W. C. Black, S. Léger and N. Ouimet, Structure-based design of COX-2 selectivity into flurbiprofen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, **9**, 307–312; (d) J. R. Kiefer, J. L. Pawlitz, K. T. Moreland, R. A. Stegeman, W. F. Hood, J. K. Gierse, A. M. Stevens, D. C. Goodwin, S. W. Rowlinson, L. J. Marnett, W. C. Stallings and R. G. Kurumbali, Structural insights into the stereochemistry of the cyclooxygenase reaction, *Nature*, 2000, **405**, 97–101; (e) R. G. Kurumbali, A. M. Stevens, J. K. Gierse, J. J. McDonald, R. A. Stegema, J. Y. Pak, D. Gildehaus, J. M. Miyashiro, T. D. Penning, K. Seibert, P. C. Isakson and W. C. Stallings, Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by antiinflammatory agents, *Nature*, 1996, **384**, 644–648.
- (a) S. L. Timofeevski, J. J. Prusakiewkiewicz, C. A. Rouzer and L. J. Marnett, Isoform-selective interaction of cyclooxygenase-2 with indomethacin amides studied by real-time fluorescence, inhibition kinetics and site-directed mutagenesis, *Biochemistry*, 2002, **41**, 9654–9662; (b) C. A. Lanzo, J. Sutin, S. Rowlinson, J. Talley and L. J. Marnett, Fluorescence quenching analysis of the association and dissociation of a diarylheterocycle to cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2: dynamic basis of cyclooxygenase-2 selectivity, *Biochemistry*, 2000, **39**, 6228–6234; (c) C. A. Lanzo, J. M. Beecham, J. Talley and L. J. Marnett, Investigation of the binding of isoform-selective inhibitors to prostaglandin endoperoxide synthases using fluorescence spectroscopy fluorescence, *Biochemistry*, 1998, **37**, 217–226.
- (a) M. H. Rahman, K. Yamasaki, Y.-H. Shin, C. C. Lin and M. Otagiri, Characterization of high affinity binding sites of non-steroidal anti-inflammatory drugs with respect to site-specific probes on human serum albumin, *Biol. Pharm. Bull.*, 1993, **16**, 1169–1174; (b) P. G. Takla, S. G. Schulman and J. H. Perrin, Measurement of flurbiprofen-human serum albumin interaction by fluorimetry, *J. Pharm. Biomed.*, 1985, **3**, 41–50; (c) R. J. Kulmacz, G. Palmer and A.-L. Tsai, Prostaglandin H Synthase: perturbation of the tyrosyl radical as a probe of anticyclooxygenase agents, *Mol. Pharmacol.*, 1991, **40**, 833–837.
- F. Boscá, M. L. Marín and M. A. Miranda, Photoreactivity of the nonsteroidal anti-inflammatory 2-arylpropionic acids with photosensitizing side effects, *Photochem. Photobiol.*, 2001, **74**, 637–655.
- J. V. Castell, M. J. Gómez-Lechón, M. A. Miranda and I. M. Morera, Phototoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs. In vitro testing of the photoproducts of butibufen and flurbiprofen, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 1992, **13**, 71–81.
- F. D. Lewis, D. M. Bassani, R. A. Caldwell and D. J. Unett, Singlet state *cis, trans* photoisomerization and intersystem crossing of 1-arylpropenes, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 10477–10485.
- H. J. Kuhn and A. Defoim, Use of phenylglyoxylic acid as chemical actinometer for the range 254–405 nm, *EPA Newsl.*, 1986, 23–25.
- V. Wintgens, L. J. Johnston and J. C. Scaiano, Use of a photoreversible fulgide as an actinometer in one and two-laser experiments, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 511–517.
- S. L. Murov, I. Carmichael and G. L. Hug, *Handbook of Photochemistry*, Marcel Dekker, Inc., New York, 2nd edn., 1993.
- S. S. Adams, B. J. Armitage and J. S. Nicholson, Hydroxybiphenyl compounds, *Ger. Offen.*, 1974, 54 pp., CODEN: GWXXBX DE 2329125 19740103 CAN 82:16565 AN 1975:16565.
- (a) E. Fasani, E. F. F. Negra, M. M. Barberis, S. Monti and A. Albini, Photoinduced C-F bond cleavage in some fluorinated 7-amino-4-quinolone-3-carboxylic acids, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 5388–5395; (b) A. Albini and S. Monti, Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones, *Chem. Soc. Rev.*, 2003, **32**, 238–250.

Excited-State Interactions in Flurbiprofen–Tryptophan Dyads

Ignacio Vayá, 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, E-46022 Valencia, Spain

Received: February 15, 2007; In Final Form: April 17, 2007

Fluorescence and laser-flash photolysis measurements have been performed on two pairs of diastereomeric dyads that contain the nonsteroidal anti-inflammatory drug (*S*)- or (*R*)-flurbiprofen (FBP) and (*S*)-tryptophan (Trp), which is a relevant amino acid present in site I of human serum albumin. The fluorescence spectra were obtained when subjected to excitation at 266 nm, where ~60% of the light is absorbed by FBP and ~40% is absorbed by Trp; the most remarkable feature observed in all dyads was a dramatic fluorescence quenching, and the residual emission was assigned to the Trp chromophore. In addition, an exciplex emission was observed as a broad band between 380 and 500 nm, especially in the case of the (*R,S*) diastereomers. The fluorescence lifetimes (τ_F) at $\lambda_{em} = 340$ nm were clearly shorter in the dyads than in Trp-derived model compounds; in contrast, the values of τ_T at $\lambda_{em} = 440$ nm (exciplex) were much longer. On the other hand, the typical FBP triplet–triplet transient absorption spectrum was obtained when subjected to laser-flash photolysis, although the signals were less intense than when FBP was directly excited under the same conditions. The main photophysical events in FBP–Trp dyads can be summarized as follows: (1) most of the energy provided by the incident radiation at 266 nm reaches the excited singlet state of Trp ($^1\text{Trp}^*$), either via direct absorption by this chromophore or by singlet–singlet energy transfer from excited FBP ($^1\text{FBP}^*$); (2) a minor, yet stereoselective deactivation of $^1\text{FBP}^*$ leads to detectable exciplexes and/or radical ion pairs; (3) the main process observed is intramolecular $^1\text{Trp}^*$ quenching; and (4) the first triplet excited-state of FBP can be populated by triplet–triplet energy transfer from excited Trp or by back-electron transfer within the charge-separated states.

Introduction

The biological role of proteins frequently involves selective binding to relevant substrates. This is the case of transport proteins that, upon binding, provide a carrier system for xenobiotics, either in the plasma or across membranes. The most important soluble carrier of drugs in blood is human serum albumin (HSA),¹ which is a globular protein that accounts for ~60% of the total protein in blood serum. It contains 585 amino acids, in a sequence displaying a total of 17 disulfide bridges, one free thiol, and a single tryptophan (Trp) unit.^{2–5} The exceptional binding capacity of HSA for a wide range of endogenous and exogenous ligands, together with its abundance, are determining factors for the pharmacokinetic behavior of drugs. Thus, a detailed knowledge of drug–HSA interactions is essential for the rational design of pharmaceuticals. The pioneering work performed by Sudlow and co-workers three decades ago revealed that there are two major and structurally selective binding sites in HSA, namely, site I and site II.^{6,7} Although more-recent studies have found evidence supporting the existence of several subdomains, consensus still exists that, basically, two high-affinity binding sites for small heterocyclic or aromatic compounds exist in this protein. Site I is also known as the warfarin binding site and contains the only Trp unit, whereas site II is known as the benzodiazepine binding site and contains Tyr residues.^{8,9}

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are among the most widely used therapeutic agents. They are prescribed

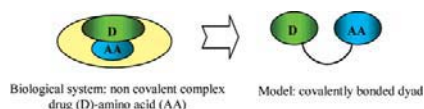
for the treatment of a broad spectrum of pathophysiological conditions, including headache, pain caused by degenerative diseases (such as osteo and rheumatoid arthritis), and fever.¹⁰ The main group of NSAIDs are the 2-arylpropionic acid derivatives, such as ibuprofen, naproxen, ketoprofen, or flurbiprofen; although they are currently marketed as racemic mixtures (with few exceptions, such as naproxen), their anti-inflammatory activity is mainly attributed to the (*S*)-enantiomer.¹¹ Such drugs bind preferentially (and often stereoselectively) to site II of HSA, by means of hydrogen bonding and electrostatic interactions. However, site I is also populated to some extent.¹²

Fluorescence techniques have been applied in the past to gain insight into the interactions between drugs and proteins,¹³ with special attention to transport proteins (for example, HSA). An interesting feature of intrinsic protein fluorescence is the high sensitivity of tryptophan to its local environment. Thus, changes in Trp emission spectra can be observed in response to protein conformational transitions, ligand binding, or subunit association; all these factors can affect the local environment of the indole chromophore. Moreover, Trp is sensitive to collisional quenching, probably because of a tendency of the excited-state of indole to act as an electron donor.¹⁴

Among the NSAIDs, the lowest singlet and triplet excited states of flurbiprofen (FBP) have recently been characterized, and the fluorescence and triplet lifetimes (τ_F and τ_T) have been shown to be highly sensitive to the medium.¹⁵ In previous work, we have used FBP triplet excited states to study drug distribution among the solution and the different HSA binding sites.^{16,17} On

* Authors to whom correspondence should be addressed. Tel. (+34)-963873440. Fax: (+34)-963879349. E-mail addresses: mcjimene@gim.upv.es; mmiranda@gim.upv.es.

SCHEME 1



the other hand, the fluorescence behavior of HSA/racemic FBP systems has also been reported.¹⁸

The objective of the present work has been to undertake a systematic fluorescence and laser-flash photolysis study on several model dyads that contain the chromophores of FBP and Trp, which are the relevant amino acids present in site I of HSA. This should give information about the operating mechanisms in the excited-state interactions using chemically well-defined systems, where the noncovalent supramolecular drug-protein interactions are modeled by the analogous intramolecular processes in covalently linked dyads (see Scheme 1 and Chart 1). Moreover, a comparison between the behavior of the diastereomeric dyads synthesized from the two FBP enantiomers and the (S)-amino acid would provide valuable indications related to the stereodifferentiating interactions with the transport proteins.

Experimental Section

Materials and Solvents. (S)- and (R)-Flurbiprofen, (S)-tryptophan methyl ester hydrochloride, (S)-tryptophanol, 1-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), and 1-hydroxybenzotriazole (BtOH) were commercially available. Their purity was checked via ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) and high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis. Reagent-grade solvents (methanol, dioxane, ethyl acetate, acetonitrile) were used without further purification. Solutions of phosphate-buffered saline (PBS) (0.01 M, pH 7.4) were prepared by dissolving phosphate-buffered saline tablets in deionized water.

General. Infrared (IR) spectra were obtained with a Fourier transform infrared (FTIR) instrument; ν_{\max} (cm⁻¹) is given for the main absorption bands. ¹H NMR spectra were measured in CDCl₃ (or, when indicated, in CD₃OD), using a 300 MHz apparatus; chemical shifts are reported in δ (ppm) values, using tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. Combustion analyses were performed at the Instituto de Química Bio-orgánica de the CSIC in Barcelona, Sapin. Isolation and purification were performed using preparative layer chromatography on silica gel (Merck), using hexane/ethyl acetate as an eluent.

Synthesis of the Substrates. To a solution of 0.8 mmol of (S)- or (R)-flurbiprofen, in acetonitrile (20 mL), 0.8 mmol of EDC and 0.8 mmol of BtOH were added as solids. The mixture was maintained under stirring, and then 0.8 mmol of (S)-TrpMe or (S)-TrpOH in 2 mL of acetonitrile were added. After 3 h, the solvent was removed under vacuum; the crude solid was dissolved in methylene chloride and washed consecutively with diluted NaHCO₃, 1 M HCl, and brine. Final purification was performed using preparative layer chromatography, followed by recrystallization.

Fluorescence Measurements. Emission spectra were recorded on a spectrofluorometer system, which was provided with a monochromator in the wavelength range of 200–900 nm. The solutions were placed into 10 mm × 10 mm quartz cells with a septum cap and were purged with nitrogen for at least 15 min before the measurements. The absorbance of the

samples at the excitation wavelength was kept lower than 0.1. For time-resolved fluorescence decay measurements, the conventional single photon counting technique was used. All the experiments were performed at room temperature (22 °C).

Laser-Flash Photolysis Experiments. Laser-flash photolysis (LFP) experiments were performed using a Q-switched Nd:YAG laser (266 nm, 4 mJ per pulse, 5 ns fwhm) coupled to a mLFP-miniaturized equipment. All transient spectra were recorded using 10 mm × 10 mm quartz cells with a capacity of 4 mL and were bubbled for 30 min with N₂ before acquisition. The absorbance of the samples was 0.2 at the laser wavelength. All the experiments were conducted at room temperature.

N-[2-(S)-(2-Fluoro[1,1'-biphenyl]-4-yl)-propanoyl]-(S)-tryptophan methyl ester, (S,S)-1. Yield: 73%; white crystals. UV λ_{\max} (log ϵ): 222 (4.5), 248 (4.2), 280 sh (3.9), 290 sh (3.7); FTIR ν (cm⁻¹): 3408, 3059, 2976, 2951, 2922, 1736, 1653, 1543, 1282, 1219, 744, 698. ¹H NMR δ : 8.02 (s, 1H), 7.54–6.99 (m, 12H), 6.83 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 5.95 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 4.93–4.87 (m, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.51 (q, 1H, J = 7.2 Hz), 3.38–3.24 (m, 2H), 1.51 (d, 3H, J = 7.2 Hz); ¹³C NMR δ : 173.4, 172.4, 161.6, 158.3, 142.5, 142.4, 136.3, 135.7, 131.2, 129.2, 128.8, 128.0, 127.9, 123.9, 122.8, 122.6, 120.0, 118.8, 115.8, 115.4, 111.6, 110.2, 53.3, 52.6, 46.8, 27.6, 18.5. Anal. Calcd. for C₂₇H₂₅FN₂O₃: C, 72.96; H, 5.67; N, 6.30. Found: C, 72.62; H, 5.73; N, 6.10.

N-[2-(R)-(2-Fluoro[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-propanoyl]-(S)-tryptophan methyl ester, (R,S)-1. Yield: 75%; white crystals. UV λ_{\max} (log ϵ): 222 (4.5), 248 (4.2), 280 sh (3.9), 290 sh (3.7); FTIR ν (cm⁻¹): 3406, 3055, 3002, 2976, 2952, 2935, 1722, 1651, 1523, 1211, 764, 737, 700. ¹H NMR δ : 7.95 (s, 1H), 7.58–7.01 (m, 12H), 6.62 (d, 1H, J = 2.1 Hz), 5.96 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 4.98–4.92 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.51 (q, 1H, J = 7.2 Hz), 3.31–3.18 (m, 2H), 1.48 (d, 3H, J = 7.2 Hz). ¹³C NMR δ : 172.8, 172.3, 161.3, 158.0, 142.6, 142.5, 136.0, 135.4, 130.9, 129.0, 128.9, 128.5, 127.7, 123.6, 122.6, 122.3, 119.7, 118.4, 115.5, 115.2, 111.2, 109.7, 52.7, 52.4, 46.5, 27.4, 18.4. Anal. Calcd. for C₂₇H₂₅FN₂O₃: C, 72.96; H, 5.67; N, 6.30. Found: C, 72.60; H, 5.70; N, 6.13.

N-[2-(S)-(2-Fluoro[1,1'-biphenyl]-4-yl)-propanoyl]-(S)-tryptophanol, (S,S)-2. Yield: 75%; white crystals. UV λ_{\max} (log ϵ): 223 (4.4), 248 (4.1), 280 sh (3.8), 290 sh (3.6); FTIR ν (cm⁻¹): 3411, 1645, 1556, 1457, 1414, 742, 698. ¹H NMR (CD₃OD) δ : 7.64–6.97 (m, 13H), 4.25–4.16 (m, 1H), 3.62 (q, 1H, J = 7.2 Hz), 3.53 (d, 2H, J = 5.4 Hz), 3.07 (dd, 1H, J_1 = 14.5 Hz, J_2 = 6.0 Hz), 2.92 (dd, 1H, J_1 = 14.5 Hz, J_2 = 6.9 Hz), 1.34 (d, 3H, J = 7.2 Hz). ¹³C NMR δ : 175.2, 161.4, 158.1, 143.7, 143.6, 137.0, 135.9, 130.6, 130.4, 130.5, 128.8, 128.3, 127.5, 123.6, 122.9, 121.2, 118.5, 118.4, 115.1, 111.2, 111.1, 63.2, 52.5, 45.9, 26.5, 17.7. Anal. Calcd. for C₂₇H₂₅FN₂O₃: C, 72.96; H, 5.67; N, 6.30. Found: C, 72.62; H, 5.73; N, 6.10.

N-[2-(R)-(2-Fluoro[1,1'-biphenyl]-4-yl)-propanoyl]-(S)-tryptophanol, (R,S)-2. Yield: 73%; white crystals. UV λ_{\max} (log ϵ): 223 (4.4), 248 (4.1), 280 sh (3.8), 290 sh (3.6); FTIR ν (cm⁻¹): 3367, 3051, 1633, 1529, 1485, 1419, 766, 741, 702. ¹H NMR (CD₃OD) δ : 7.53–6.89 (m, 13H), 4.29–4.21 (m, 1H), 3.67–3.53 (m, 3H), 2.97 (dd, 1H, J_1 = 15.0 Hz, J_2 = 6.3 Hz), 2.85 (dd, 1H, J_1 = 15.0 Hz, J_2 = 7.8 Hz), 1.42 (d, 3H, J = 7.2 Hz); ¹³C NMR δ : 176.6, 162.9, 159.6, 145.1, 145.0, 138.4, 137.4, 132.1, 132.0, 130.4, 129.8, 129.4, 129.0, 125.0, 124.5, 122.6, 119.9, 119.8, 116.4, 116.1, 112.5, 64.9, 53.8, 47.3, 27.9, 19.1. Anal. Calcd. for C₂₇H₂₅FN₂O₃: C, 72.96; H, 5.67; N, 6.30. Found: C, 72.62; H, 5.73; N, 6.10.

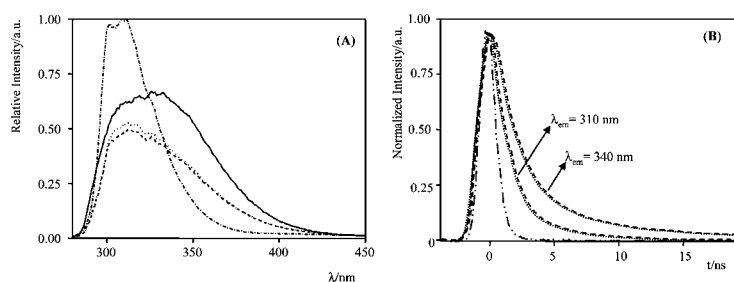
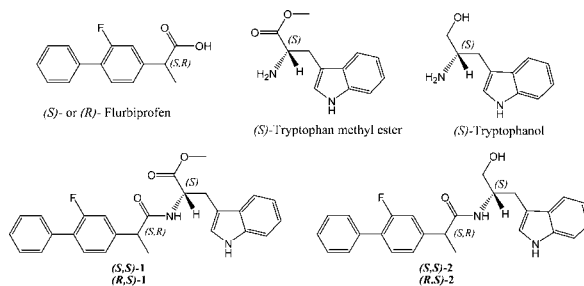


Figure 1. (A) Fluorescence emission ($\lambda_{exc} = 266$ nm) of (---) (*S*)- or (*R*)-FBP, (—) HSA, (---) (*S*)-FBP/HSA 1:1, and (---) (*R*)-FBP/HSA 1:1 in 0.01 M PBS. (B) Decay of (---) (*S*)-FBP/HSA 1:1 and (---) (*R*)-FBP/HSA 1:1 in 0.01 M PBS at $\lambda_{em} = 310$ and 340 nm, respectively [(---) denotes lamp emission]. In both panels, the FBP and HSA concentrations were 2.5×10^{-5} M.

CHART 1



Results and Discussion

Fluorescence Measurements on FBP/HSA Supramolecular Systems. In the absence of protein, the fluorescence spectra of (*S*)- or (*R*)-FBP in phosphate buffer (PBS)/air at $\lambda_{exc} = 266$ nm were expectedly identical ($\lambda_{max} = 310$ nm);¹⁵ they are shown in Figure 1A. The emission of HSA alone was also recorded; it displayed the typical maximum due to the Trp residue ($\lambda_{max} = 340$ nm).¹⁴ As shown in Figure 1A, the spectra recorded for equimolar mixtures of (*S*)- or (*R*)-FBP and HSA were less intense and contained the contributions of both drug and protein (Trp) emissions, although the latter was clearly predominating. The dual fluorescence from two distinct excited species is in good agreement with the fact that the decays measured at 310 nm (maximum of FBP emission) and 340 nm (due to the Trp chromophore of HSA) are clearly different, as can be observed in Figure 1B.

Photophysical Studies on FBP-Trp Dyads in Acetonitrile. To obtain more information on the excited-state interactions between FBP and Trp, several model dyads that contain (*S*)-FBP or (*R*)-FBP and the main fluorophore of HSA (Trp) were synthesized via conventional methods and studied using fluorescence (steady-state and time-resolved) and laser-flash photolysis. In these well-defined systems, the two chromophores are covalently linked through an amide bridge. The chemical structures of the parent compounds, together with those of the dyads, are presented in Chart 1. Because of their poor solubility in aqueous media, the experiments were conducted in acetonitrile.

The first selected dyads were (*S,S*)-1 and (*R,S*)-1, which are two diastereomeric amides obtained by condensation of (*S*)- or (*R*)-flurbiprofen and (*S*)-tryptophan methyl ester (TrpMe). Their UV-absorption spectra are shown in Figure 2; they were identical to the added spectra of the corresponding isolated FBP and Trp units, at the same concentrations. This reveals the absence of any significant ground-state intramolecular interactions between the two moieties.

The fluorescence spectra of (*S,S*)-1 and (*R,S*)-1 were obtained when excitation at 266 nm occurred, where $\sim 60\%$ of the light is absorbed by the biphenyl and $\sim 40\%$ is absorbed by the indole chromophore, using isoabsorptive solutions ($A_{266} = 0.08$) of (*S*)-FBP and (*S*)-TrpMe as models for comparison. The most remarkable feature observed in both dyads was a dramatic quenching (see Figure 3A); the residual emission was assigned to the Trp chromophore ($\lambda_{em} = 340$ nm),¹⁴ rather than to FBP. Moreover, a possible exciplex emission was observed as a broad band between 380 nm and 500 nm (Figure 3B), especially in the case of (*R,S*)-1. The fluorescence lifetimes at $\lambda_{em} = 340$ nm were clearly shorter in the dyads (ca. 0.9 ns) than in (*S*)-TrpMe (6.4 ns), indicating a dynamic quenching. By contrast, the values of τ_F at $\lambda_{em} = 440$ nm were much longer (7.6 and 5.1 ns for (*S,S*)-1 and (*R,S*)-1, respectively).

On the other hand, the typical FBP T-T transient absorption spectrum was obtained when subjected to LFP of (*S,S*)- and (*R,S*)-1 at 266 nm, although the signals were less intense than when FBP was directly excited under the same conditions (see Figure 4A). The triplet lifetimes (decays at 360 nm, shown in

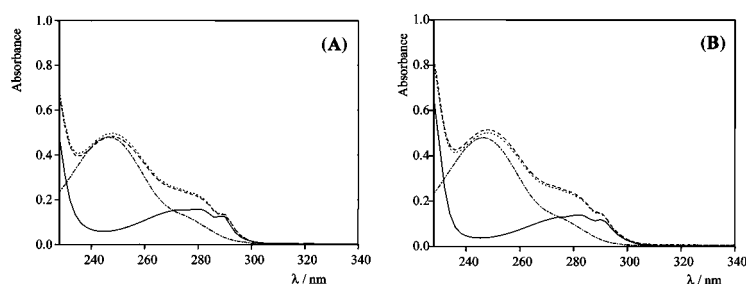


Figure 2. (A) UV-absorption spectra of (---) (*S*)-FBP, (—) (*S*)-TrpMe, (---) (*S,S*)-1, and (···) (*R,S*)-1 in acetonitrile at a concentration of 2.5×10^{-3} M. (B) UV-absorption spectra of (---) (*S*)-FBP, (—) (*S*)-TrpOH, (---) (*S,S*)-2, and (···) (*R,S*)-2 in acetonitrile at a concentration of 2.5×10^{-3} M.

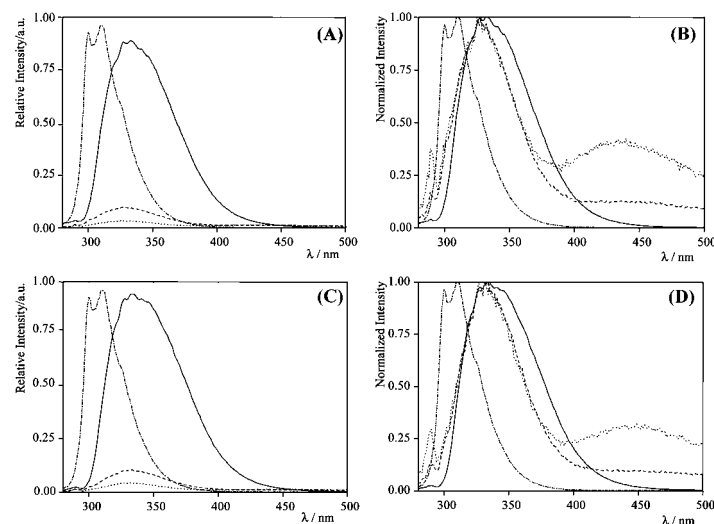


Figure 3. (A) Fluorescence spectra of (---) (*S*)-FBP, (—) (*S*)-TrpMe, (---) (*S,S*)-1, and (···) (*R,S*)-1. (B) Normalized fluorescence spectra of (---) (*S*)-FBP, (—) (*S*)-TrpMe, (---) (*S,S*)-1, and (···) (*R,S*)-1. (C) Fluorescence spectra of (---) (*S*)-FBP, (—) (*S*)-TrpOH, (---) (*S,S*)-2 and (···) (*R,S*)-2. (D) Normalized fluorescence spectra of (---) (*S*)-FBP, (—) (*S*)-TrpOH, (---) (*S,S*)-2, and (···) (*R,S*)-2. All the experiments were conducted in deaerated acetonitrile, at a concentration of 1.0×10^{-5} M, using an excitation wavelength of 266 nm.

Figure 4B) were the same in the dyads as in FBP (ca. $24 \mu\text{s}$ for the three compounds), indicating the lack of intramolecular interaction in the excited triplet state.

In view of the short fluorescence lifetime of the Trp chromophore in (*S,S*)-1 and (*R,S*)-1 (close to the detection limit of our instrument), and to minimize possible errors, two new diastereomeric dyads were synthesized, starting from (*S*)-tryptophanol (*S*)-TrpOH, which is a Trp analog with a longer-lived singlet excited state (8.1 ns).

The fluorescence spectra of solutions of (*S*)-FBP, (*S*)-TrpOH, (*S,S*)-2, and (*R,S*)-2 in acetonitrile are shown in Figure 3C. Again, a strong quenching was observed for both dyads, and the remaining emission was attributed to the Trp chromophore. The fluorescence lifetimes were shorter in the dyads (ca. 1.1 ns in both cases) than in the model (*S*)-TrpOH, indicating intramo-

lecular dynamic quenching. After normalization of the three emissions, the exciplex was observed as a broad band of low intensity in the interval between 380 nm and 500 nm (see Figure 3D); a significant stereodifferentiation in the exciplex lifetimes (measured at 440 nm) was observed, with values of 6.7 ns for the (*S,S*) isomer and 5.0 ns for the (*R,S*) isomer.

In regard to the LFP studies on (*S,S*)-2 and (*R,S*)-2 in acetonitrile, the only signal observed was the typical FBP T-T absorption spectrum (see Figure 4C). The triplet lifetimes were the same in the dyads as in FBP (ca. $24 \mu\text{s}$ for the five compounds); thus, no intramolecular interaction seemed to occur in the excited triplet state.

The main deactivation processes that can happen when subjected to excitation of a dyad that contains covalently linked FBP and Trp subunits are indicated in Scheme 2 and can be

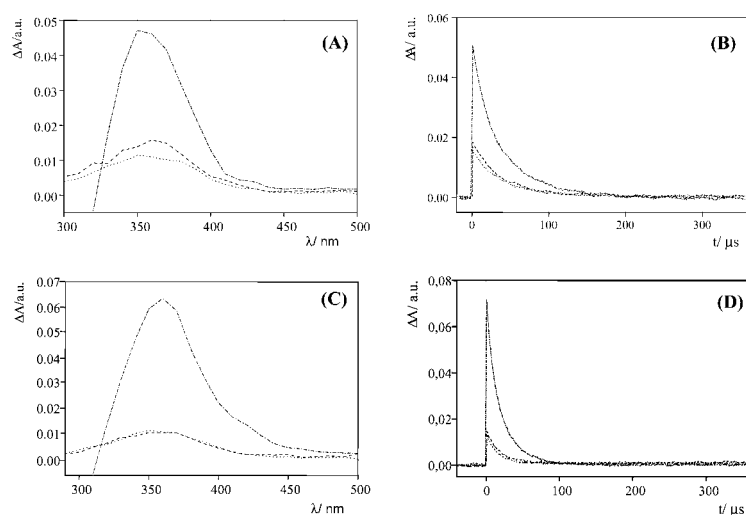
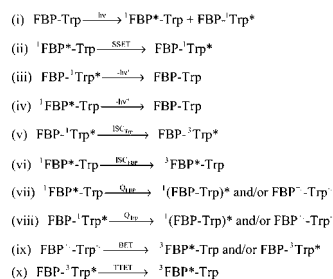


Figure 4. (A) Laser-flash photolysis (LFP) of (---) (S)-FBP, (---) (S,S)-1, and (---) (R,S)-1 in MeCN/N₂. (Transient spectra obtained 6 μs after the laser pulse.) (B) Decays from panel A, monitored at 360 nm. (C) LFP of (---) (S)-FBP, (---) (S,S)-2, and (---) (R,S)-2 in MeCN/N₂. (Transient spectra obtained 6 μs after the laser pulse.) (D) Decays from panel C, monitored at 360 nm.

SCHEME 2



summarized as follows. Initial excitation at 266 nm (route i in Scheme 2) could lead to the first singlet excited state of either FBP or Trp, as determined from the UV-absorption spectra (see Figure 2). Singlet-singlet energy transfer (SSET) from ${}^1\text{FBP}^*$ ($E_s = 99$ kcal/mol)¹⁵ to the Trp moiety ($E_s = 96$ kcal/mol)¹⁹ would be thermodynamically allowed (route ii in Scheme 2). Radiative deactivation from ${}^1\text{Trp}^*$ or ${}^1\text{FBP}^*$ is represented in Scheme 2 as routes iii and iv, respectively. Routes v and vi in Scheme 2 correspond to intersystem crossing (ISC) processes. Intramolecular quenching (Q) of the first excited singlet state of FBP or Trp, to give exciplexes or radical ion pairs, is illustrated by process routes vii and viii in Scheme 2. Back-electron transfer (BET) from the radical ion pairs could afford the FBP and/or Trp first triplet excited state (route ix in Scheme 2). Finally, triplet-triplet energy transfer (TTET) from Trp ($E_T = 71$ kcal/mol)²⁰ to FBP ($E_T = 65$ kcal/mol)¹⁵ would also be possible (route x in Scheme 2).

The relative energies of the different excited states of FBP-Trp dyads are shown in Figure 5, together with the most relevant excited-state processes. The fluorescence quantum yields obtained using the free amino acid Trp as a standard ($\phi_F = 0.13$ in water),¹⁹ together with the corresponding rate constants for the models ((S)-FBP, (S)-TrpMe, (S)-TrpOH) and for compounds (S,S)-1, (R,S)-1, (S,S)-2, and (R,S)-2, are given in Table 1.

The fluorescence spectra of (S,S)-1, (R,S)-1, (S,S)-2, and (R,S)-2 show that emission occurs exclusively from the Trp chromophore ($\lambda_{\text{max}} = 340$ nm)¹⁴ (see Figure 3). Then, k_Q for the Trp unit (route step viii in Scheme 2) was determined by means of eq 1:

$$k_Q = \frac{1}{\tau_F} - \frac{1}{\tau_{F(\text{model})}} \quad (1)$$

where τ_F is the fluorescence lifetime in the dyad and $\tau_{F(\text{model})}$ is the fluorescence lifetime of the model (S)-TrpMe or (S)-TrpOH. Thus, k_Q was determined to be $9.54 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ for both diastereomers of **1** and $7.86 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ in the case of dyads **2**. From the experimental ϕ_F and τ_F values, the k_F value that corresponds to process route iii in Scheme 2 was obtained using eq 2:

$$k_F = \frac{\phi_F}{\tau_F} \quad (2)$$

Taking into account the aforementioned data, the quantum yield for intramolecular dynamic quenching ($\phi_{Q(\text{dyn})}$) was estimated through eq 3:

$$\phi_{Q(\text{dyn})} = \frac{k_Q}{k_F} \times \phi_F \quad (3)$$

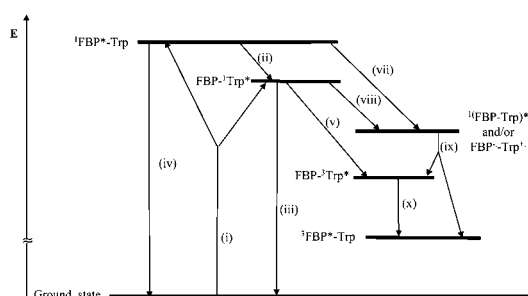


Figure 5. Qualitative energetic diagram for the different excited states and reactive intermediates generated when excitation of FBP–Trp dyads occurred.

TABLE 1: Photophysical Properties of (S)-FBP, (S)-TrpMe, (S)-TrpOH, and the Dyads in Acetonitrile or 1,4-Dioxane, in Deaerated Media^a

compound	ϕ_F	τ_F (ns) ^b	k_F ($\times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$)	k_Q ($\times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$)	$\phi_{Q(\text{dyn})}$	$\phi_{Q(\text{ov})}$	ϕ_T	τ_T (μs)
Acetonitrile, $\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$								
(S)-FBP	0.21	1.7	1.24				0.71	24
(S)-TrpMe	0.34	6.4	0.53				nd ^c	
(S,S)-1	0.04	0.9	0.44	9.54	0.87	0.88	0.26	24
(R,S)-1	0.02	0.9	0.22	9.54	0.87	0.94	0.22	24
(S)-TrpOH	0.38	8.1	0.47				nd ^c	
(S,S)-2	0.04	1.1	0.36	7.86	0.87	0.89	0.19	24
(R,S)-2	0.02	1.1	0.18	7.86	0.87	0.95	0.10	24
1,4-Dioxane, $\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$								
(S)-FBP	0.25	1.8	1.38				0.70	26
(S)-TrpMe	0.31	4.2	0.74				nd ^c	
(S,S)-1	0.08	1.2	0.67	5.95	0.71	0.74	0.15	14
(R,S)-1	0.03	1.2	0.25	5.95	0.71	0.88	0.13	14
(S)-TrpOH	0.35	5.4	0.64				nd ^c	
(S,S)-2	0.08	1.5	0.53	4.82	0.73	0.77	0.19	17
(R,S)-2	0.05	1.5	0.33	4.82	0.73	0.86	0.13	17

^a Generally, errors were <5% of the stated values. ^b Measured at 310 nm for (S)-FBP and at 340 nm for the other compounds. ^c Not detected.

These ϕ_Q values were identical for all dyads (0.87). Because the Trp chromophore is absorbing only ca. 40% of the incident photons at 266 nm (see Figures 2A and 2B), the obtained ϕ_Q values clearly confirm an efficient singlet–singlet energy transfer from FBP to Trp (process route ii in Scheme 2), which should be thermodynamically favored, given the relative singlet energies of the isolated chromophores (see previous discussion). Despite the lack of stereodifferentiation in the quenching of $^1\text{Trp}^*$, the spectra shown in Figures 3A and 3C were clearly different for each pair of diastereomers. From the area under the emission curves, the values obtained for overall quenching ($\phi_{Q(\text{ov})}$) were 0.88 and 0.94 (for (S,S)-1 and (R,S)-1) and 0.89 and 0.95 (for (S,S)-2 and (R,S)-2). Thus, the “dynamic” and the “overall” fluorescence quenching have approximately the same values for the (S,S)-dyads, but they were somewhat different for the (R,S)-diastereomers. This can be due to a minor, yet stereoselective, deactivation of $^1\text{FBP}^*$, leading to exciplexes and/or radical ion pairs (route vii in Scheme 2), which is more important for the (R,S)-diastereomers than for the corresponding (S,S)-dyads. The exciplexes were actually observed after magnification of the emission spectra between 380 nm and 500 nm as a broad band of low intensity (see Figures 3B and 3D); they were expectedly much more intense in the case of the (R,S)-diastereomers.

In regard to the Trp fluorescence quenching mechanism, it could involve, in principle, either electron transfer or exciplex formation. Application of the Weller equation,²¹ taking into

account the Trp singlet energy²⁰ and the relevant redox potentials,²² allowed us to estimate the ΔG values that correspond to the two possible pathways; both were found to be exergonic ($\Delta G_{\text{ET}} = -15 \text{ kcal/mol}$ and $\Delta G_{\text{EXC}} = -10 \text{ kcal/mol}$). All values would be ca. 3 kcal/mol more negative for FBP quenching, because of the higher singlet energy of this chromophore.

Another point of interest was the origin of the FBP triplet. Its quantum yield (ϕ_T) was determined from the LFP experiments and was determined to be in the range of 0.1–0.3. Triplet generation could, in principle, occur via several pathways: (a) intersystem crossing from ^1FBP (see process route vi in Scheme 2), which can be safely ruled out, because no fluorescence from this chromophore was detected; (b) triplet–triplet energy transfer from $^3\text{TrpMe}$ (see process route x in Scheme 2) [although this process is exergonic ($\Delta G \approx -4 \text{ kcal/mol}$), its contribution must be minor, because the intersystem crossing quantum yield for conversion of $^1\text{Trp}^*$ to $^3\text{Trp}^*$ in the dyads (process (v) in Scheme 2) must be of the same order as ϕ_F]; (c) BET in the radical ion pairs (see process route ix in Scheme 2), resulting from quenching of the excited singlets ($\Delta G \approx -12 \text{ kcal/mol}$) [this is indeed the most feasible pathway, because the added $\phi_{Q(\text{ov})}$ and ϕ_T terms clearly exceed unity].

Photophysical Studies on FBP–Trp Dyads in 1,4-Dioxane. To disfavor the occurrence of intramolecular electron transfer, fluorescence measurements were also performed in 1,4-dioxane, the dielectric constant of which is lower than that of acetonitrile

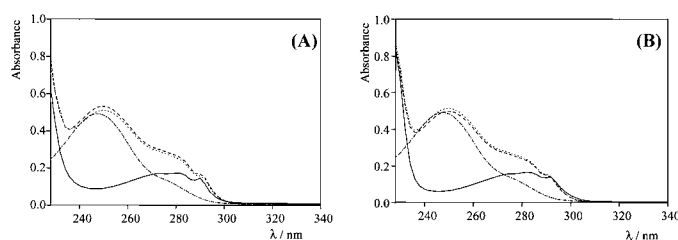


Figure 6. (A) UV-absorption spectra of (---) (S)-FBP, (—) (S)-TrpMe, (---) (S,S)-1, and (· · ·) (R,S)-1 in 1,4-dioxane at a concentration of 2.5×10^{-5} M. (B) UV-absorption spectra of (---) (S)-FBP, (—) (S)-TrpOH, (---) (S,S)-2, and (· · ·) (R,S)-2 in 1,4-dioxane at a concentration of 2.5×10^{-5} M.

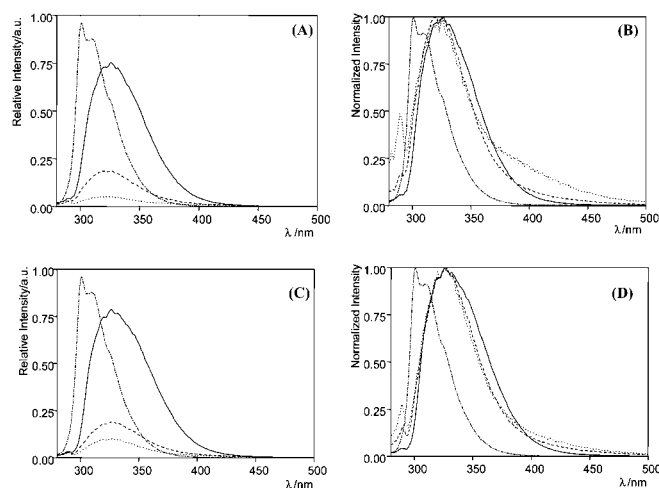


Figure 7. (A) Fluorescence spectra in deaerated 1,4-dioxane of (---) (S)-FBP, (—) (S)-TrpMe, (---) (S,S)-1, and (· · ·) (R,S)-1. (B) Normalized fluorescence spectra in deaerated 1,4-dioxane of (---) (S)-FBP, (—) (S)-TrpMe, (---) (S,S)-1, and (· · ·) (R,S)-1. (C) Fluorescence spectra in deaerated 1,4-dioxane of (---) (S)-FBP, (—) (S)-TrpOH, (---) (S,S)-2, and (· · ·) (R,S)-2. (D) Normalized fluorescence spectra in deaerated 1,4-dioxane of (---) (S)-FBP, (—) (S)-TrpOH, (---) (S,S)-2, and (· · ·) (R,S)-2.

(2.2 vs 37.5).²³ The UV-absorption spectra of (S,S)-1 and (R,S)-1 (see Figure 6A) were identical to the added spectra of the isolated FBP and Trp units, at the same concentrations, in accordance with the lack of any significant ground-state intramolecular interactions between the two moieties.

The most remarkable feature in the fluorescence spectra of (S,S)-1, (R,S)-1, (S,S)-2, and (R,S)-2, when subjected to excitation at 266 nm, was a dramatic quenching (see Figures 7A and 7C). The remaining emission was assigned to the Trp chromophore. In contrast, the possible exciplex emission (the band between 380 nm and 500 nm; see Figures 7B and 7D) was less intense in 1,4-dioxane. The fluorescence lifetimes at $\lambda_{em} = 340$ nm were clearly shorter in the dyads (between 1.2 and 1.5 ns) than in (S)-TrpMe (4.2 ns) or in (S)-TrpOH (5.4 ns), which is indicative of a dynamic quenching; at $\lambda_{em} = 440$ nm, τ_F was the same for both diastereomers of each pair (1.9 ns for **1** and 3.0 ns for **2**).

In regard to the LFP experiments, the typical FBP T-T transient absorption spectrum was obtained when subjected to

excitation at 266 nm;¹⁵ the signals were less intense than when FBP was directly excited under the same conditions (see Figures 8A and 8C). The triplet lifetimes (decays at 360 nm, shown in Figure 8B and 8D) were shorter in the dyads (14 μ s) than in FBP, which is indicative of some degree of intramolecular interaction (may be exciplex formation) in the excited triplet state.

The relevant quantum yields and rate constants (obtained as detailed previously for the corresponding data in acetonitrile) are given in Table 1.

Also, in this solvent, emission occurs exclusively from the Trp chromophore ($\lambda_{max} = 340$ nm). The k_Q for the Trp unit (route step viii in Scheme 2), using eq 1, was determined to be $5.95 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ for dyads **1** and $4.82 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ in the case of dyads **2**. From ϕ_F and τ_F , and using eq 2, the k_F corresponding to process route iii in Scheme 2 was obtained. The quantum yield values for intramolecular dynamic quenching ($\phi_{Q(dyn)}$), estimated through eq 3, were identical for each pair of dyads (0.71 for **1** and 0.73 for **2**). Again, as the Trp chromophore is

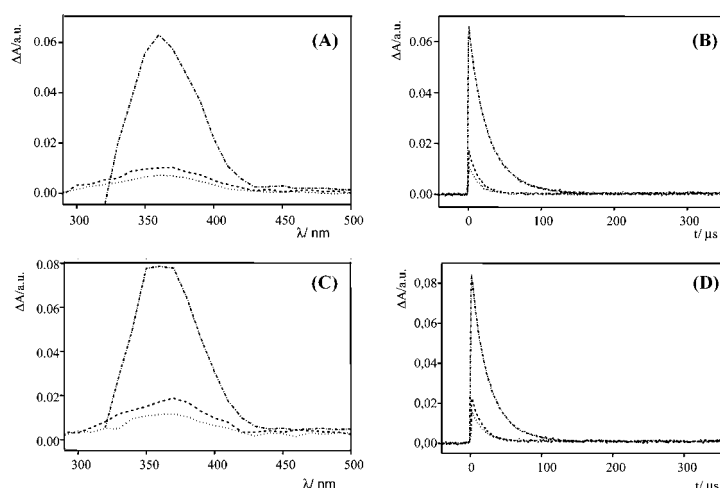


Figure 8. (A) LFP of (· · ·) (S)-FBP, (---) (S,S)-1, and (· · ·) (R,S)-1 in 1,4-dioxane/N₂. (Transient spectra obtained 3 μs after the laser pulse.) (B) Decays from panel A, monitored at 360 nm. (C) LFP of (· · ·) (S)-FBP, (---) (S,S)-2, and (· · ·) (R,S)-2 in 1,4-dioxane/N₂. (Transient spectra obtained 3 μs after the laser pulse.) (D) Decays from panel C, monitored at 360 nm.

not absorbing all the incident light (only ca. 40% of the photons at 266 nm; see Figures 6A and 6B), the obtained ϕ_Q corroborate an efficient singlet–singlet energy transfer from FBP to Trp (process route ii in Scheme 2). The spectra shown in Figures 7A and 7C were clearly different for each pair of diastereomers, despite the lack of stereodifferentiation in dynamic quenching of ¹Trp*. The overall quenching data ($\phi_{Q(ov)}$) were 0.74 and 0.88 (for (S,S)-1 and (R,S)-1, respectively) and 0.77 and 0.86 (for (S,S)-2 and (R,S)-2, respectively). Thus, the “dynamic” and “overall” fluorescence quenching are substantially different for the (R,S)-diastereomers. Such a stereodifferentiation process is attributed to deactivation of ¹FBP*, which leads to exciplexes and/or ion pairs (route vii in Scheme 2).

Application of the Weller equation,²¹ taking into account the Trp singlet energy¹⁹ and the relevant redox potentials,²² allowed us to estimate the ΔG values that correspond to the two possible pathways ($\Delta G_{ET} = +10$ kcal/mol and $\Delta G_{EXC} = -6$ kcal/mol). Thus, stereodifferentiation can be made higher in dioxane by slowing the electron-transfer process and increasing the exciplex involvement.

Finally, it must be noted that the triplet quantum yields (ϕ_T) determined from the LFP experiments are in the range of 0.1–0.2, and the overall quenching quantum yields ($\phi_{Q(ov)}$) fall in the range of 0.7–0.9. Because of the fact that the added $\phi_T + \phi_{Q(ov)}$ values do not exceed unity, there is no need to invoke in this case (BET) in the radical ion pair as the origin of triplet formation. This agrees well with the fact that electron-transfer quenching would be endergonic in 1,4-dioxane, as stated in the previous paragraph.

Conclusions

In summary, for the flurbiprofen–tryptophan (FBP–Trp) dyads studied, the main photophysical events can be summarized as follows:

- (1) Most of the energy provided by the incident radiation at 266 nm reaches the excited Trp (¹Trp*), either via direct absorption by this chromophore or by singlet–singlet energy transfer (SSET) from the excited FBP (¹FBP*);
- (2) A minor, yet stereoselective, deactivation of ¹FBP* leads to detectable exciplexes and/or radical ion pairs;
- (3) The main process observed is intramolecular ¹Trp* quenching; and
- (4) The first triplet excited-state of FBP can be populated by TTET from ³Trp* or by back-electron transfer (BET) from the charge-separated states. The singlet excited-state processes observed in the dyads explain the fluorescence quenching and the predominating Trp-like emission of HSA/FBP supramolecular systems. In contrast, the lack of relevant interactions in the excited triplet states of the dyads cannot be correlated with the laser-flash photolysis studies on human serum albumin (HSA)/FBPMe conjugates,¹⁶ where the dramatic lengthening of the triplet lifetimes within the protein binding sites must be attributed to the particular properties of the microenvironment provided by the tertiary structure of these biomolecules (i.e., conformational restrictions, inhibition of self-quenching or triplet–triplet annihilation, protection from attack by oxygen or other reagents, etc.).

Acknowledgment. Financial support from the MCYT (CTQ2004-03811) and the Generalitat Valenciana (GV06/099) is gratefully acknowledged. Author I.V. thanks MEC for a fellowship.

References and Notes

- (1) Peters, T. *All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications*; Academic Press: New York, 1995.
- (2) He, K. M.; Carter, D. C. *Nature* **1992**, *358*, 209.
- (3) Dockal, M.; Carter, D. C.; Rucker, F. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 29303.

- (4) Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K. *Protein Eng.* **1999**, *12*, 439.
- (5) Kragh-Hansen, U.; Chuang, V. T. G.; Otagiri, M. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 695.
- (6) Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N. *Mol. Pharmacol.* **1976**, *12*, 1052.
- (7) Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N. *Mol. Pharmacol.* **1975**, *11*, 824.
- (8) Fehske, K. J.; Müller, W. E.; Schläfer, U. *Prog. Drug Protein Binding* **1981**, *5*, 15.
- (9) Chuang, V. T. G.; Otagiri, M. *Chirality* **2006**, *18*, 159.
- (10) Lewis, A. J.; Furst, D. E. *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Mechanisms and Clinical Uses*, 2nd Edition; Marcel Dekker: New York, 1994.
- (11) Evans, A. M. *J. Clin. Pharmacol.* **1996**, *36*, 7S.
- (12) Rahman, M. H.; Yamasaki, K.; Shin, Y. H.; Lin, C. C.; Otagiri, M. *Biol. Pharm. Bull.* **1993**, *16*, 1169.
- (13) Lackowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd Edition; Plenum Press: New York, 1999; Chapter 16.
- (14) Longworth, J. W. Intrinsic fluorescence of proteins. In *Time Resolved Fluorescence Spectroscopy in Biochemistry and Biology*; Cundall, R. B.; Dale, R. E., Eds.; Plenum Press: New York, 1983.
- (15) Jiménez, M. C.; Miranda, M. A.; Tormos, R.; Vayá, I. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 1038.
- (16) Jiménez, M. C.; Miranda, M. A.; Vayá, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10134.
- (17) Vayá, I.; Bueno, C. J.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *ChemMed-Chem* **2006**, *1*, 1015.
- (18) Tarkis, P. G.; Schulman, S. G.; Perrin, J. H. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1985**, *3*, 41.
- (19) Murov, S. L.; Carmichael, I.; Hug, G. L. *Handbook of Photochemistry*, 2nd Edition; Marcel Dekker: New York, 1993.
- (20) Triplet energy of the model indole taken from ref 19.
- (21) Weller, A. *Z. Phys. Chem.* **1982**, *133*, 93.
- (22) The values of ΔG for the different processes were determined using the equations given in ref 21, with the following redox potentials, taken from ref 19: $E_{OX} = 1.015$ V (indole) and $E_{RED} = -2.55$ V (biphenyl).
- (23) *Handbook of Chemistry and Physics*, 85th Edition; CRC Press: Boca Raton, FL, 2004.

Triplet Excited States as Chiral Reporters for the Binding of Drugs to Transport Proteins

M. Consuelo Jiménez, Miguel A. Miranda,* and Ignacio Vayá

Departamento de Química, Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC, Universidad Politécnica de Valencia, camino de Vera s/n, E-46022 Valencia, Spain

Received March 7, 2005; E-mail: mmiranda@qim.upv.es

Human serum albumin (HSA) is the most important transport protein. One of its main functions is to carry different endogenous and exogenous agents (including drugs) around the blood stream to achieve their efficient and selective delivery to the specific targets.¹

The pioneering work performed by Sudlow and co-workers three decades ago revealed that there are two major and structurally selective binding sites in HSA, namely, site I and site II.² Although more recent studies have found evidence supporting the existence of several subdomains, consensus still exists that there are basically two high affinity binding sites for small heterocyclic or aromatic compounds in this protein.³

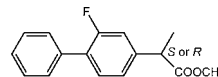
As the knowledge of drug–HSA interactions is essential for understanding the biodistribution, metabolism, elimination, and pharmacological effect of drugs in the body, a number of techniques have been used to address this problem. They include equilibrium dialysis, ultrafiltration, ultracentrifugation, calorimetry, fluorescence quenching, circular dichroism, liquid chromatography, capillary electrophoresis, NMR diffusion measurements, etc.^{4,5} Each method presents advantages and limitations; the latter are mainly related to sensitivity, interferences, diffusion problems, or lack of reproducibility arising from a complicated workup.

Arylpropionic acid derivatives are the main group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). They are currently marketed as racemic mixtures (with few exceptions such as naproxen); however, their anti-inflammatory activity is mainly attributed to the *S*-isomer.⁶ Those drugs bind preferentially (and often stereoselectively) to site II of HSA by means of hydrogen bonding and electrostatic interactions.⁷ Upon methylation of the carboxy group, binding occurs preferentially to site I, where hydrophobic interactions predominate.⁸

The aim of the present work has been to explore the suitability of triplet excited states as chiral reporters for the important issue of drug binding to transport proteins. As the properties of these states are very sensitive to the experienced microenvironment,⁹ they should allow one to study the drug distribution among the bulk solution and the different protein binding sites. More interestingly, triplet lifetime measurements would provide valuable information on the nature of drug–HSA complexes, such as strength of the interaction, conformational restrictions, protection from attack by oxygen or other reagents, stereochemical requirements, etc. Previously, laser flash photolysis (LFP) has been employed for the study of carprofen–HSA complexes.¹⁰ However, in this case, fast reaction of the drug triplet state with the Trp unit of site I limits its possibilities to be used as a probe. To circumvent this problem, an “inert” triplet would be more adequate as reporter, while residing as observer in the HSA binding sites. Flurbiprofen (FBP) is an NSAID of the 2-arylpropionic acid class used for several medical purposes, such as for the treatment of osteoarthritis, rheumatoid arthritis, post-operative dental pain, and ocular disorders.¹¹ The

lowest triplet excited state of FBP has recently been characterized,¹² and its lifetime has been found to be highly sensitive to the medium. In the present work, the triplet state of FBP methyl ester (FBPMe, Chart 1) has been used as probe for the binding sites of HSA.

Chart 1



The choice of FBPMe has been done for experimental convenience since its hydrophobic character should favor inclusion within HSA (preferentially in site I, as stated above). Both (*R*)- and (*S*)-FBPMe have been investigated in order to obtain valuable information about the possible stereodifferentiation in the interaction of drugs with proteins.

Aqueous solutions containing (*S*)-FBPMe and HSA (molar ratio from 10:1 to 0.5:1) were prepared in neutral buffer (0.01 M PBS) and submitted to laser flash photolysis. The transient absorption spectrum obtained after laser excitation ($\lambda_{exc} = 266$ nm) of an aerated 2.5×10^{-5} M solution of (*S*)-FBPMe displayed a maximum at 360 nm, assigned to the first triplet excited state.¹² Its decay (Figure 1) followed a first-order exponential law with a lifetime of 1.5 μ s.

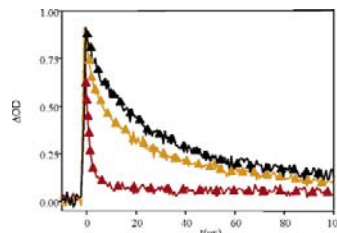


Figure 1. Laser flash photolysis ($\lambda_{exc} = 266$ nm) of (*S*)-FBPMe (burgundy triangles), (*S*)-FBPMe/HSA 2:1 (gold triangles), and (*S*)-FBPMe/HSA 0.5:1 (black triangles) in 0.01 M PBS. Normalized decays monitored at 360 nm. The concentration of (*S*)-FBPMe was 2.5×10^{-5} M in all cases.

Remarkably, in the presence of HSA, this species lived much longer (see Figure 1) and did not exhibit a first-order exponential decay. Thus, when the [(*S*)-FBPMe]/[HSA] ratio was between 1:1 and 0.5:1, the signal followed a second-order exponential decay with lifetimes of 4.1 and 31.5 μ s. The negligible contribution of the 1.5 μ s lifetime component indicated the absence of free (*S*)-FBPMe in solution under these conditions.

It is noteworthy that protein-bound (*S*)-FBPMe has dramatically longer lifetimes than the noncomplexed form (τ_T values up to 21-

fold higher). This can be attributed to a slower deactivation via nonradiative processes, due to important restrictions in the degrees of freedom inside the HSA binding sites, where a microenvironment is provided that protects the triplet excited state from attack by oxygen or other reagents. In this context, the fact that two different τ_T values were measured in the presence of HSA can be correlated with the existence of two types of binding sites. At higher [(S)-FBPMe]/[HSA] ratios (from 1.25:1 to 10:1), three lifetime values (1.5, 4.1, and 31.5 μ s) were necessary to obtain a good fitting of the decay signal (also shown in Figure 1). This can be clearly associated with the presence of free (S)-FBPMe in solution, in addition to the two HSA-bound species.

Parallel experiments were carried out for (R)-FBPMe. In PBS solution, the transient absorption spectra and the triplet lifetimes did not differ from those of the S-enantiomer. By contrast, when included within HSA, two components with τ_T values of 157.6 and 16.6 μ s were found for (R)-FBPMe. These values are much higher than those obtained for (S)-FBPMe, indicating a remarkable stereodifferentiation between the two enantiomers in the protein binding process. A comparison between the decays monitored at 360 nm for (S)-FBPMe, (S)-FBPMe/HSA, and (R)-FBPMe/HSA is shown in Figure 2.

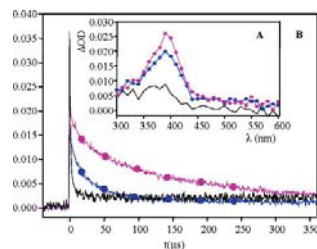


Figure 2. Laser flash photolysis ($\lambda_{exc} = 266$ nm) of 2.5×10^{-5} M (S)- or (R)-FBPMe (—), as well as 1:1 solutions of (S)-FBPMe/HSA (blue lines) and (R)-FBPMe/HSA (magenta lines) in 0.01 M PBS, under air. (A) Spectra obtained 3.7 μ s after the laser pulse. (B) Decays monitored at 360 nm.

Regression analysis of the decay curves for several [FBPMe]/[HSA] ratios was performed to obtain the values of the A_1 , A_2 , and A_3 coefficients (components with different lifetimes). On the basis of the known fact that the high affinity site of 2-arylpropionic acid methyl esters is site I,⁸ the major (longer-lived) component under nonsaturating conditions was assigned to FBPMe within this site, while the minor (shorter-lived) component was assigned to site II-bound FBPMe. To obtain independent evidence supporting this assignment, additional LFP experiments were performed in the presence of warfarin, a well-established probe for site I.¹³ In agreement with our initial assumption, addition of this probe resulted in a reduced contribution of the longer lifetime components (attributed to site I). Thus, at 1:1.1 [FBPMe]/[HSA]/[warfarin] molar ratio this value dropped to ca. 50% (as compared with ca. 70% in the absence of warfarin).

The trends clearly show (Figure 3A) that, for the same [FBPMe]/[HSA] ratio, inclusion within HSA is slightly favored for the S-isomer. Besides, a significant stereodifferentiation is observed when comparing the occupation level of the two sites, with higher preference for site I in the case of (S)-FBPMe. In general, when the [FBPMe]/[HSA] ratio is low (far from saturation), all of the

drug is protein-bound and the high affinity site I is selectively populated. Progressive increase of the [FBPMe]/[HSA] ratio results in saturation of site I and (subsequently) site II. This leads to a decrease of site selectivity (Figure 3B) and the appearance of increasing amounts of free FBPMe.

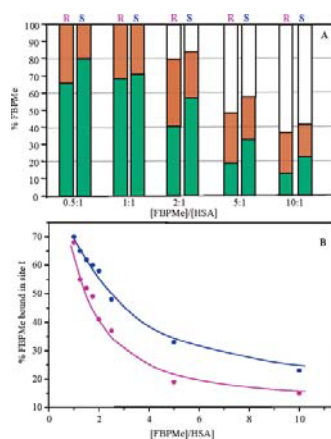


Figure 3. (A) Percent of (S)-FBPMe and (R)-FBPMe: free (white), in site I (green), and in site II (brown). (B) Percent of (R)-FBPMe (magenta circles) and (S)-FBPMe (blue circles) in site I of HSA at different [FBPMe]/[HSA] ratios.

In summary, the triplet excited state of FBPMe has been used as a chiral reporter for the two binding sites of HSA. The occupation level of the binding sites in HSA has been estimated from regression analysis of the triplet decays at several [FBPMe]/[HSA] ratios. A remarkable stereodifferentiation has been found in the triplet lifetimes within the protein microenvironment.

Acknowledgment. The UPV (Grant PI 2003-0522 and fellowship to I.V.), the MEC (Grant CTQ2004-03811), and Generalitat Valenciana (Grant GV2004-0536 and Grupos03/082) are gratefully acknowledged for financial support.

References

- He, X. M.; Carter, D. C. *Nature* **1992**, *358*, 209.
- Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N. *Mol. Pharmacol.* **1976**, *12*, 1052.
- Dockal, M.; Carter, D. C.; Rucker, F. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 29303.
- Jia, Z.; Ramstad, T.; Zhong, M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *405*, 413.
- Lucas, L. H.; Price, K. E.; Larive, C. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14258.
- Evans, A. M. *J. Clin. Pharmacol.* **1996**, *36*, 7S.
- Lapicque, F.; Muller, N.; Payan, E.; Dubois, N. *Clin. Pharmacokinet.* **1993**, *25*, 115.
- Rahman, M. H.; Yamasaki, K.; Shin, Y.-H.; Lin, C. C.; Otogiri, M. *Biol. Pharm. Bull.* **1993**, *16*, 1169.
- Bohne, C.; Barra, M.; Boch, R.; Abuin, E. B.; Scailano, J. C. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1992**, *65*, 249.
- Lhiaubet-Vallat, V.; Sarabia, Z.; Bosca, F.; Miranda, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9538.
- Davies, N. M. *Clin. Pharmacokinet.* **1995**, *28*, 100.
- Jiménez, M. C.; Miranda, M. A.; Tormos, R.; Vayá, I. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 1038.
- Felske, K. J.; Müller, K. J.; Schäfer, U.; Wollert, U. *Prog. Drug Protein Binding* **1981**, 5–15.

JA0514489

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

Ignacio Vayá, 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, E-46022 Valencia, Spain. Phone(+34)963877344, Fax: (+34)-963879349. E-mail: mcjimene@qim.upv.es ; mmiranda@qim.upv.es .

RECEIVED DATE:

Keywords: binding site, serum albumin, stereodifferentiation, time resolved spectroscopy, triplet excited state.

Abstract

Laser flash photolysis (LFP) has been used to determine the degree of binding of (*S*)- or (*R*)-flurbiprofen methyl ester (FBPMe) to human and bovine serum albumins. Regression analysis of the triplet decay of the drug ($\lambda = 360$ nm) in the presence of the proteins led to a satisfactory fitting when considering a set of three lifetimes; the corresponding A_1 , A_2 and A_3 preexponential coefficients can be correlated with the presence of FBPMe in the bulk solution and within the two known binding sites. The most remarkable differences between HSA and BSA were found under non-saturating conditions; thus, when the [FBPMe]/[SA] ratio was 1:1, all the drug was bound to HSA, whereas 20-30 % of it remained free in the bulk solution in the presence of BSA. The LFP approach was also applicable to the study of more complex FBPMe/HSA/BSA mixtures; the obtained results were in good agreement with the previous findings in FBPMe/HSA and FBPMe/BSA systems. This suggests the possibility of making use of the transient triplet-triplet absorption for investigating the distribution of a drug between several compartments in different host biomolecules.

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

Ignacio Vayá, 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, E-46022 Valencia, Spain. Phone(+34)963877344, Fax: (+34)-963879349. E-mail: mcjimene@gim.upv.es ; mmiranda@gim.upv.es .

Introduction

Serum albumins (SA) are transport proteins very abundant in blood and plasma; one of their main functions is to carry several endogenous and exogenous agents (i.e. fatty acids, drugs or metabolites) in the bloodstream, to accomplish a selective delivery to specific targets.^{1,2} Binding of drugs to SA in biological systems is a key process that can modulate a number of properties of the carried agent, such as increased solubility in plasma, decreased toxicity, protection against oxidation or prolongation of the *in vivo* half-life; hence, binding is essential for understanding biodistribution, metabolism, elimination or pharmacological effect of drugs in the body.

Human (HSA) and bovine (BSA) serum albumins have been widely used as model proteins for diverse studies.³⁻⁵ Both of them have a well known primary structure and a similar folding.⁶

The primary structure of HSA, which is synthesized and secreted by the liver, consists of a single chain of 585 amino acid residues, with 17 disulfide bridges, one tryptophan (Trp) and one free cysteine; the secondary structure is defined by 67% of α helix of six turns, and the three-

dimensional structure can be described in terms of three domains, each of them constituted in turn by two subdomains.⁷

Similarly, BSA is also among the most studied proteins in biochemical research; BSA and HSA have 76% sequence identity, but BSA contains two Trp residues, instead of one.¹

Binding of small molecules (i.e. drugs or fatty acids) to HSA and BSA has been studied for years through different techniques in order to understand the role of transport proteins and also to establish the structural basis for designing new therapeutic agents.⁸⁻¹⁸

Recent studies have found evidence supporting the existence of a high number of binding sites in HSA.^{19,20} However, agreement exists that there are basically two major and structurally selective binding sites for small heterocyclic or aromatic compounds, named site I and site II according to Sudlow's classification.²¹⁻²³

Likewise, numerous studies on the drug-protein binding process have used BSA as model, due to its similarity to HSA.³⁻⁵ However, the binding of a variety of ligands to the bovine protein has demonstrated to be different from that found for the human protein.²⁴⁻³⁶ Several techniques have been used for binding studies, including equilibrium dialysis, ultrafiltration, ultracentrifugation, calorimetry, fluorescence quenching, circular dichroism, liquid chromatography, capillary electrophoresis, NMR diffusion measurements and recently also room temperature phosphorescence.⁸⁻¹⁸ Thus, the development of new tools for the investigation of drug-protein interactions, as well as for the comparison between binding of drugs to HSA and BSA, seems important to help integration of the existing knowledge.

Arylpropionic acid derivatives are a group of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Currently, they are marketed as racemic mixtures (with few exceptions such as naproxen); however, the pharmacological activity is mainly due to the (*S*)-isomer.³⁷ These drugs bind preferentially (and often stereoselectively) to site II of HSA by means of hydrogen bonding and electrostatic interactions.³⁸

As the properties of the excited states are very sensitive to the experienced microenvironment,³⁹ they could allow to study drug distribution among the bulk solution and the different protein binding sites. Previously, time resolved techniques have been employed for the study of carprofen-HSA complexes.^{40,41} However, in this case fast reaction of the drug triplet state with the Trp unit of site I limits its possibilities to be used as a probe. This problem can be circumvented by choosing “inert” excited states as HSA binding site reporters. Thus, the behavior of (*S*)- and (*R*)- flurbiprofen (FBP) in the presence of HSA or BSA has been recently published.⁴² Moreover, a significant stereodifferentiation has been observed in the triplet lifetimes of the methyl esters of (*S*)- and (*R*)- FBP (FBPMe) in the presence of HSA (reported as a preliminary communication).⁴³ Methylation of the carboxy group is not a trivial structural change, as the resulting ester FBPMe binds preferentially to site I, where hydrophobic interactions predominate.⁴⁴ In the present work, we wish to report in full the interaction between the excited states of FBPMe (Chart 1) and the binding sites of HSA. These studies have now been extended to BSA, as the binding behavior can be significantly different. Remarkably, the laser flash photolysis (LFP) technique has proven to be useful to determine the distribution of FBPMe between BSA and HSA in mixtures of both proteins, indicating a higher preference for the human albumin. This suggests the possibility of making use of the transient triplet-triplet absorption for investigating the distribution of a drug between several compartments in different host biomolecules.

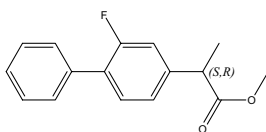


Chart 1

Experimental Section

Materials and solvents

The two proteins HSA and BSA were purchased from Sigma; (*S*)- and (*R*)-FBP were obtained from Aldrich.

(*S*)-FBPMe was synthesized by treatment of (*S*)- or (*R*)- FBP (200 mg, 0.82 mmol) with SOCl_2 (0.82 mmol) and MeOH as solvent. The reaction mixture was maintained under reflux during 2 h. The organic solvent was removed *in vacuo*. The remaining oil was dissolved in methylene chloride (20 mL), washed with saturated NaHCO_3 (twice, 10 mL), 1M HCl (twice, 10 mL) and brine (twice, 10 mL). The resulting oil was submitted to silica gel preparative chromatography (methylene chloride as eluent) to afford the desired products in nearly quantitative yield.

Solutions of FBPMe/SA in 0.01 M PBS buffer (pH = 7.4) were prepared from Sigma phosphate buffered saline tablets.

Absorption spectra

Optical spectra in different solvents were measured on a Perkin Elmer Lambda 35 UV/Vis Spectrophotometer.

Laser flash photolysis experiments

Laser flash photolysis experiments were performed by using a Q-switched Nd:YAG laser (Quantel Brilliant, 266 nm or 355 nm for photosensitized experiments, 4 mJ per pulse, 5 ns fwhm) coupled to a mLFP-111 Luzchem miniaturized equipment. All transient spectra were recorded employing 10 x 10 mm² quartz cells with 4 mL of solution. The absorbance of FBPMe was *ca.* 0.2 at the laser wavelength. All the experiments were carried out in phosphate buffer (PBS, pH = 7.4, 0.01 M) at room temperature (22 °C) and under air atmosphere.

For the studies in the presence of SA, a battery of aqueous solutions containing (*S*)- or (*R*)-FBPMe and SA (molar ratios between 10:1 and 0.5:1) were prepared in neutral buffer (0.01 M PBS) and stored overnight at 4 °C to ensure a complete equilibrium between the drug and the protein. As an example, the experimental procedure to prepare a solution containing FBPMe and SA in 10:1 molar ratio is briefly described: to 20 mL of a 2.5×10^{-5} M solution of (*S*)- or (*R*)-FBPMe in PBS, 25 μ L of SA 2×10^{-3} M in PBS were added. The resulting solution (4 mL) was placed in a quartz cuvette and submitted to LFP (10 shots for monitoring decay at 360 nm). To obtain an accurate decay trace, this experiment was repeated at least three times with fresh sample; triplet lifetimes and fittings of the decay traces were coincident within the experimental error margins. To obtain the transient absorption spectra from 700 to 290 nm, fresh sample (drug and protein concentration 2.5×10^{-5} M) was submitted to LFP in a regular interval of 10 nm (10 shots per wavelength).

Results and Discussion

Laser flash photolysis of (*S*)- and (*R*)- FBPMe in the presence of HSA

The first series of studies were focused on the behavior of (*S*)-FBPMe in HSA. In the absence of this protein, the transient absorption spectra obtained after excitation at 266 nm (PBS, air) displayed the typical maximum at 360 nm due to the $T_1 \rightarrow T_n$ absorption. The decay at 360 nm followed a first order exponential law with $\tau_T = 1.5 \mu$ s. For the experiments in the presence of HSA, a battery of aqueous solutions containing (*S*)-FBPMe and HSA (molar ratios between 5:1 and 0.5:1) were prepared in phosphate buffer and submitted to LFP. Remarkably, the decay at 360 nm in the presence of the protein occurred at longer timescales (Figure 1) and required application of a multiexponential function to achieve a satisfactory fitting.

When the [*S*]-FBPMe]/[HSA] ratio was between 1:1 and 0.5:1, a double exponential decay was observed with lifetimes of 4.1 and 31.5 μ s. The insignificant contribution of the 1.5 μ s component indicated that no free (*S*)-FBPMe was present in the bulk solution under these

conditions. The fact that two different τ_T values were necessary to fit the decay in the presence of HSA would agree with the presence of two different types of microenvironments (*i.e.*, two different binding sites) in the protein. The longer triplet lifetimes values of protein-bound (*S*)-FBPMe can be due to a slower deactivation of the excited states inside the HSA binding sites; in such pockets, a particular microenvironment is created, which is able to protect the triplet excited state from the attack by a second (*S*)-FBPMe molecule, oxygen or other reagents.

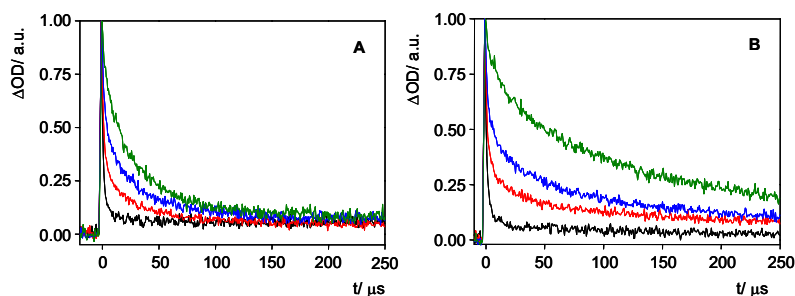


Figure 1. **A.** Laser flash photolysis ($\lambda_{exc} = 266$ nm) of (*S*)-FBPMe (black), (*S*)-FBPMe/HSA 5:1 (red), (*S*)-FBPMe/HSA 2.5:1 (blue) and (*S*)-FBPMe/HSA 1:1 (green) in 0.01 M PBS. **B.** Laser flash photolysis ($\lambda_{exc} = 266$ nm) of (*R*)-FBPMe (black), (*R*)-FBPMe/HSA 5:1 (red), (*R*)-FBPMe/HSA 2.5:1 (blue) and (*R*)-FBPMe/HSA 1:1 (green) in 0.01 M PBS. The normalized decays are monitored at 360 nm. The concentration of (*S*)- or (*R*)-FBPMe was 2.5×10^{-5} M in all cases.

At [(*S*)-FBPMe]/[HSA] ratios from 1.25:1 to 5:1, three lifetime values (1.5, 4.1 and 31.5 μ s) were necessary to obtain a good fitting of the decay signal (some of these decays are also shown in Figure 1A). This can be explained taking into account the two (*S*)-FBPMe/HSA-bound species, in addition to free (*S*)-FBPMe.

Regression analysis of the decay curves for different [(*S*)-FBPMe]/[HSA] ratios provided the values of the A_1 , A_2 and A_3 coefficients associated with the three components of different lifetimes, correlated with free, site I-bound and site II-bound FBPMe. Based on the known fact

that the high affinity site of 2-arylpropionic acids methyl esters is site I,⁴³ the major component under non-saturating conditions (which was that with the longest τ_T) was assigned to (*S*)-FBPMe within site I; consequently, the minor component (with $\tau_T = 4.1 \mu\text{s}$) was assigned to site II-bound FBPMe. The distribution of (*S*)-FBPMe among the binding sites and the bulk solution (provided by the A_1 , A_2 and A_3 coefficients) is represented in Figure 2 (left).

In order to look for a possible stereodifferentiation in the binding behavior of the two FBPMe enantiomers, a similar study was performed on (*R*)-FBPMe in the presence of HSA.

In PBS solution the transient absorption spectra and the triplet lifetimes of the two FBPMe enantiomers did not differ from each other, as expected. By contrast, when the [*R*]-FBPMe]/[HSA] ratio was between 1:1 and 0.5:1, a double exponential decay was observed with lifetimes values of τ_T 157.6 μs and 16.6 μs were found for (*R*)-FBPMe (Figure 1B). These values were much higher than those obtained for (*S*)-FBPMe, indicating a remarkable stereodifferentiation between the two enantiomers in the protein binding process.

At [*R*]-FBPMe]/[HSA] ratios from 1.25:1 to 5:1, three lifetime values were again necessary to obtain a good fitting of the decay signal; they corresponded to the two (*R*)-FBPMe/HSA-bound species ($\tau_T = 16.6$ and 157.5 μs), in addition to free (*R*)-FBPMe ($\tau_T = 1.5 \mu\text{s}$).

As in the case of (*S*)-FBPMe, the major component under non-saturating conditions (the one with $\tau_T = 157.6 \mu\text{s}$) was assigned to (*R*)-FBPMe within site I and the minor component (with $\tau_T = 16.6 \mu\text{s}$) to site II-bound FBPMe. From the A_1 , A_2 and A_3 coefficients, the distribution of (*R*)-FBPMe among the binding sites and the bulk solution was obtained (Figure 2, right).

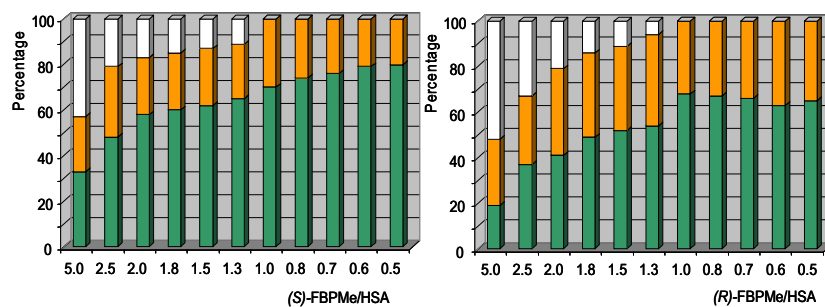


Figure 2. Percentage of FBPMe: free (white), in site I (green) and in site II (orange) of HSA from the A_1 , A_2 and A_3 values of the multiexponential decay at 360 nm. **Left.** (*S*)-FBPMe. **Right.** (*R*)-FBPMe.

As a control experiment, in order to ensure that the observed stereodifferentiation in the decay kinetics was real, the behavior of racemic FBPMe in the presence of HSA was compared with that of the pure enantiomers. In agreement with the expectations, the decay obtained at 360 nm for a 1:1 FBPMe/HSA molar ratio was perfectly matched by the semi sum of the decays of (*S*)- and (*R*)-FBPMe with HSA under the same conditions (Figure 3).

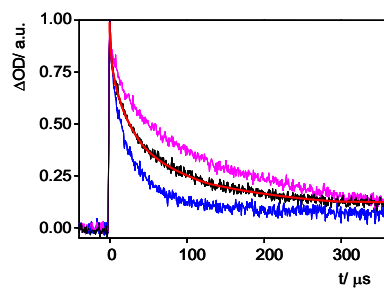


Figure 3. Decay of the 360 nm band obtained by laser flash photolysis ($\lambda_{\text{exc}} = 266$ nm) of racemic FBPMe/HSA 1:1 (black), (*S*)-FBPMe/HSA 1:1 (blue) and (*R*)-FBPMe/HSA 1:1 (magenta). The ester concentration was 2.5×10^{-5} M in all cases. The red line corresponds to the semi sum of (*S*)-FBPMe and (*R*)-FBPMe.

Laser flash photolysis of (*S*)- and (*R*)- FBPMe in the presence of BSA

To investigate the behavior of (*S*)-FBPMe within the bovine protein, parallel experiments were carried out in the presence of different amounts of BSA. Thus, PBS solutions of (*S*)-FBPMe and BSA (molar ratio in the range from 5:1 to 0.5:1) were submitted to LFP. Again, two components with $\tau_T = 4.6$ and $19.3 \mu\text{s}$ were obtained for the triplet decay ($\lambda = 360 \text{ nm}$) inside the protein. This is shown in Figure 4A.

Regression analysis of the decay curves for [*S*]-FBPMe]/[BSA] ratios from 5:1 to 0.5:1 (where some free drug is present) allowed us to obtain the values of the A_1 , A_2 and A_3 coefficients. The major component under non-saturating conditions ($\tau_T = 19.3 \mu\text{s}$) was assigned to (*S*)-FBPMe in the high affinity binding site (site I), while the minor component (with $\tau_T = 4.6 \mu\text{s}$) was attributed to (*S*)-FBPMe within site II. These results indicate that, again, the triplet excited state of (*S*)-FBPMe is more protected against deactivation (due to attack by a second (*S*)-FBPMe molecule, oxygen, other reagents, etc.) within the microenvironment provided by site I in BSA.

The triplet excited state of site I-bound (*S*)-FBPMe lived longer within BSA than within HSA (*ca.* 1.5 times); however, no significant differences were found in the corresponding values of site II-bound (*S*)-FBPMe (4.6 vs. 4.1 μs).

Concerning the site occupancy, as estimated from the A coefficients of the regression analysis curves, Figure 5 (left) shows that the main differences between the behavior of the two proteins were found at low [*S*]-FBPMe]/[SA] ratios. Thus, when the ratio was 1:1, all the FBPMe was bound to the human protein, whereas more than 30 % of it remained free in the bulk solution in the presence of the bovine protein, under otherwise identical experimental conditions (compare Figs. 2 and 5).

Similar studies were carried out for (*R*)-FBPMe in the presence of BSA. As usually, from the LFP kinetic decays of (*R*)-FBPMe/BSA solutions (Figure 4), two values of τ_T (2.8 and 19.7 μs) were obtained and attributed to site II and site I-bound (*R*)-FBPMe, respectively.

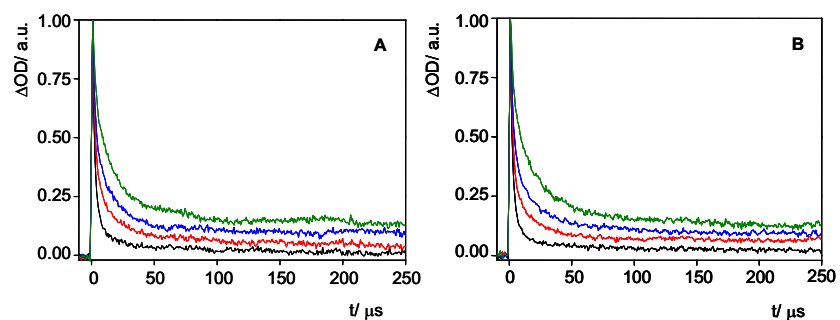


Figure 4. **A.** Laser flash photolysis ($\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$) of (*S*)-FBPMe (black), (*S*)-FBPMe/BSA 5:1 (red), (*S*)-FBPMe/BSA 2.5:1 (blue) and (*S*)-FBPMe/BSA 1:1 (green) in 0.01 M PBS. **B.** Laser flash photolysis ($\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$) of (*R*)-FBPMe (black), (*R*)-FBPMe/BSA 5:1 (red), (*R*)-FBPMe/BSA 2.5:1 (blue) and (*R*)-FBPMe/HSA 1:1 (green) in 0.01 M PBS. The normalized decays are monitored at 360 nm. The concentration of (*S*)- or (*R*)-FBPMe was $2.5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ in all cases.

The site occupancy is shown in Figure 5 (right), confirming the trend observed for the (*S*)-enantiomer. The main differences between the behavior of the two proteins were found again at low [*R*]-FBPMe]/[SA] ratios.

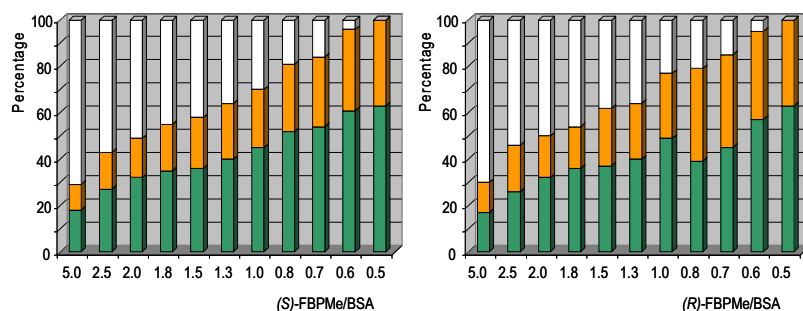


Figure 5. Percentage of FBPMe: free (white), in site I (green) and in site II (orange) of BSA from the A_1 , A_2 and A_3 values of the multiexponential decay at 360 nm. **Left.** (*S*)-FBPMe. **Right.** (*R*)-FBPMe.

Competition studies on human versus bovine protein occupancy

As stated above, the most remarkable differences between HSA and BSA as carrier proteins for FBPMe were found under non-saturating conditions. A similar behavior was observed for the two FBPMe enantiomers.

This fact suggested the possibility of making use of the transient triplet-triplet absorption for investigating the distribution of a drug between several compartments in different host biomolecules. To proof the concept, an experiment was designed in which (*R*)-FBPMe was added to a mixture of HSA and BSA in buffered aqueous solution (molar ratio 1.4:1:1). Of course, this is not a real situation, but it could be a good model to check the feasibility of this new methodology.

When the (*R*)-FBPMe/HSA/BSA mixture was flash-photolyzed at 266 nm, the expected transient absorption spectrum was obtained corresponding to the typical biphenyl-like T-T band with $\lambda_{\max} = 360$ nm. For the regression analysis of the decay at the absorption maxima, four lifetime components (identical to the τ_T values in sites I and II of both albumins) were assumed. Their relative contributions (determined from the preexponential coefficients) led to the

following values: site I of HSA, 55%; site II of HSA, 26%; site I of BSA, 12 %; and site II of BSA, 7 %. These results support that the affinity for the human protein is higher under the non-saturating conditions employed and confirm the preferential occupancy of site I in both albumins.

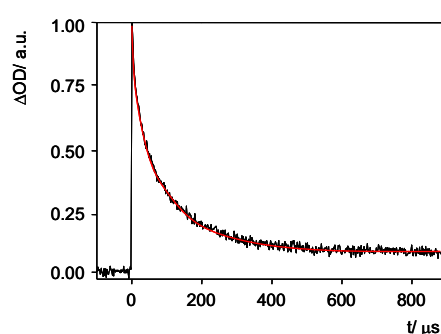


Figure 6. Laser flash photolysis ($\lambda_{exc}= 266$ nm) of (*R*)-FBPMe/HSA/BSA at molar ratio 1.4:1.0:1.0. The red trace corresponds to the simulated decay, assuming that the triplet lifetimes are the same as in the experiments without mixing the proteins, and using the following percentages of occupancy: site I of HSA, 55%; site II of HSA, 26%; site I of BSA, 12 %; and site II of BSA, 7 %.

Conclusions

Using flurbiprofen methyl ester as a probe, it has been demonstrated that the laser flash photolysis technique constitutes a valuable tool for the study of drug binding to transport proteins. Regression analysis of the decay kinetics of the transient absorption spectra corresponding to the triplet-triplet absorption provides precise information on the number of binding sites and their degree of occupancy. Triplet lifetimes inside the binding sites are in general much longer than in the bulk aqueous solution and depend on the nature of the sites, on the origin (human or bovine) of the employed serum albumin, and/or on the stereochemistry of the drug. Although similar trends are observed in HSA and BSA, the main differences between

the two proteins are found under non-saturating conditions; thus, when the [FBPMe]/[SA] ratio is 1:1, all the drug is bound to HSA, whereas 20-30 % of it remains free in the bulk solution in the presence of BSA. Finally, the results obtained using mixtures of the two proteins suggest the possibility of making use of the transient triplet-triplet absorption for investigating the distribution of a drug between several compartments in different host biomolecules.

Acknowledgements. Financial support from the MICYT (CTQ2004-03811) and the Generalitat Valenciana (GV06/099) is gratefully acknowledged. I. V. thanks MEC for a fellowship.

References

- (1) Peters, T. *All About Albumin; Biochemistry, Genetics and Medical Applications*, Academic Press, 1995.
- (2) Carter, D. C.; Ho, J. X. *Adv. Protein Chem.* **1994**, *45*, 153.
- (3) Li, B. X.; Zhang, Z. J.; Zhao, L. X. *Anal. Chim. Acta.* **2002**, *468*, 65.
- (4) Kwing, T. C. *Clin. Chim. Acta.* **1985**, *151*, 193.
- (5) Svenson, C. K.; Woodruff, M. N.; Baxter, J. G.; Lalka, D. *Clin. Pharmacokinet.* **1985**, *11*, 450.
- (6) Peters, T. *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 161.
- (7) He, X. M.; Carter, D. C. *Nature.* **1992**, *358*, 209.
- (8) Jia, Z.; Ramstad, T.; Zhong, M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *405*, 413.
- (9) Lucas, L. H.; Price, K. E.; Larive, C. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14258.
- (10) Zini, R.; Morin, D.; Jouenne, P.; Tillement, J. P. *Life Sci.* **1988**, *43*, 2103.
- (11) Barne, J.; Chamouard, J. M.; Houin, G.; Tillement, J. P. *Clin. Chem.* **1985**, *31*, 60.
- (12) Bowers, W. F.; Fulton, S.; Thompson, J. *Clin. Pharmacokinet.* **1984**, *9*, 49.
- (13) Aki, H.; Yamamoto, M. *J. Pharm. Pharmacol.* **1989**, *41*, 674.

- (14) Parikh, H. H.; McElwaine, K.; Balasubramanian, V.; Leung, W.; Won, D.; Morris, M. E.; Ramanathan, M. *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 632.
- (15) Frostell-Karlsson, A.; Remaeus, A.; Roos, H.; Andersson, K.; Borg, P.; Hämäläinen, M.; Karlsson, R. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1986.
- (16) Shibukawa, A.; Kuroda, Y.; Nakagawa, T. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *18*, 1047.
- (17) Chu, Y. H.; Avila, L. Z.; Biebuyck, H. A.; Whitesides, G. M. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2915.
- (18) Wei, Y.; Dong, C.; Liu, D.; Shuang, S.; Huie, C. W. *Biomacromolecules.* **2007**, *8*, 761.
- (19) Petitpas, I.; Bhattacharya, A. A.; Twine, S.; East, M.; Curry, S. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 22804.
- (20) Zunszain, P. A.; Ghuman, J.; Komatsu, T.; Tsuchida, E.; Curry, S. *BMC Struct. Biol.* **2003**.
- (21) Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N. *Mol. Pharmacol.* **1975**, *11*, 824.
- (22) Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N. *Mol. Pharmacol.* **1976**, *12*, 1052.
- (23) Fehske, K. J.; Müller, K. J.; Schläfer, U.; Wollert, U. *Progr. Drug Protein Binding.* **1981**, *5*.
- (24) Sun, P.; Hoops, A.; Hartwick, R. A. *J. Chromatogr. B.* **1994**, *661*, 335.
- (25) Whitlam, J. B.; Crooks, M. J.; Brown, K. F.; Pedersen, P. V. *Biochem. Pharmacol.* **1979**, *28*, 675.
- (26) Wei, S.; Zhao, L.; Cheng, X.; Lin, J.-M. *Anal. Chim. Acta.* **2005**, *545*, 65.
- (27) Kphita, H.; Matsushita, Y.; Moriguchi, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 937.
- (28) Gelamo, E. L.; Silva, C. H. T. P.; Imasato, H.; Tabak, M. *Biochim. Biophys. Acta.* **2002**, *1594*, 84.
- (29) Relamo, E. L.; Tabak, M. *Spectrochim. Acta Part A.* **2000**, *56A*, 2255.
- (30) Fleury, F.; Kudelina, I.; Nabiew, I. *FEBS Lett.* **1997**, *406*, 151.

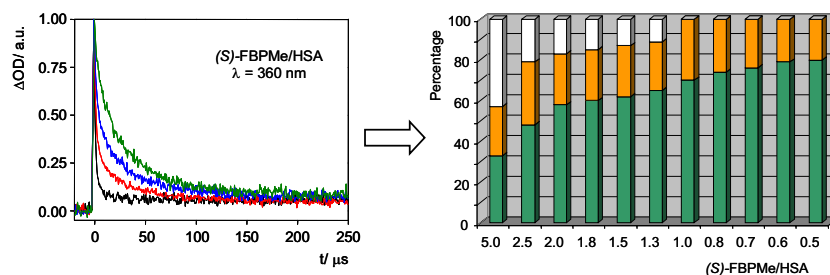
- (31) Kuchimanchi, K. R.; Ahmed, M. S.; Johnston, T. P.; Mitra, A. K. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 659.
- (32) Silva, D.; Cortez, C.; Louro, S. R. W. *Spectrochim. Acta, Part A.* **2004**, *60A*, 1215.
- (33) Valsami, G. N.; Panayotis, M.; Koupparis, M. A. *Pharm. Res.* **1991**, *8*, 888.
- (34) Muller, W. E.; Wollert, U. *Biochem. Pharmacol.* **1976**, *25*, 141.
- (35) Kitamura, K.; Kume, M.; Yamamoto, M.; Takegami, S.; Kitade, T. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *36*, 411.
- (36) Sulkowska, A. *J. Mol. Struct.* **2002**, *614*, 227.
- (37) Evans, A. M. *J. Clin. Pharmacol.* **1996**, *36*, 7S.
- (38) Lopicque, F.; Muller, N.; Payan, E.; Dubois, N. *Clin. Pharmacokinet.* **1993**, *25*, 115.
- (39) Jiménez, M. C.; Miranda, M. A.; Tormos, R.; Vayá, I. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 1038.
- (40) Lhiaubet-Vallet, V.; Sarabia, Z.; Boscá, F.; Miranda, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9538.
- (41) Lhiaubet-Vallet, V.; Boscá, F.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 423.
- (42) Vayá, I.; Bueno, C. J.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1015.
- (43) Jiménez, M. C.; Miranda, M. A.; Vayá, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10134.
- (44) Rahman, M. H.; Yamasaki, K.; Shin, Y-H; Lin, C. C.; Otagiri, M. *Biol. Pharm. Bull.* **1993**, *16*, 1169.

Suggestion for the table-of-contents entry

**Laser flash photolysis for determining multiple site occupancy in drug-protein conjugates.
A comparison between human and bovine serum albumins using flurbiprofen methyl ester
as probe**

Ignacio Vayá, M. Consuelo Jiménez and Miguel A. Miranda**

The figures show the percentage of free (white), site I-bound (green) and site II-bound (orange) (S)-FBPMe as obtained from the A_1 , A_2 and A_3 values of the multiexponential decay of the triplet-triplet absorption at 360 nm, in the presence of HSA and BSA.



DOI: 10.1002/cmdc.200600061

Use of Triplet Excited States for the Study of Drug Binding to Human and Bovine Serum Albumins

Ignacio Vayá, Carlos J. Bueno, M. Consuelo Jiménez,* and Miguel A. Miranda*^[a]

The triplet excited states of (S)- and (R)-flurbiprofen (FBP) have been used as reporters for the microenvironments experienced within the binding sites of human and bovine serum albumins. Regression analysis of triplet decay provides valuable information on the degree of protection that these excited states are afforded from attack by a second FBP molecule, oxygen, or other reagents. The multiexponential fitting of these decays can be satisfactorily

correlated with the distribution of the drug among the two binding sites and its presence as the noncomplexed form in the bulk solution. This assignment has been confirmed by using (S)-ibuprofen or capric acid as selective site II replacement probes. Triplet lifetimes and site occupancy are sensitive to the type of serum albumin employed (human versus bovine). Finally, the binding behaviour of (S)- and (R)-FBP exhibits little stereoselectivity.

Introduction

Serum albumins (SA) are very abundant proteins in blood and plasma. One of their most important physiological roles is to carry a variety of agents such as fatty acids, drugs, or metabolites in the bloodstream to deliver them selectively to specific targets.^[1,2] The binding of drugs to SA in biological systems is a key process, as it is relevant to the modulation of a number of properties, including the drug's solubility in plasma, toxicity, susceptibility to oxidation, and in vivo half-life.

Human (HSA) and bovine (BSA) serum albumins have been used as model proteins for diverse studies.^[3–5] They have a well-known primary structure, and a similar higher-order structure. The binding of small molecules (i.e. drugs or fatty acids) to HSA and BSA has been studied for years with different techniques in order to understand the functions of this unique carrier, and to disclose the structural basis for designing new therapeutic agents.^[6]

Thus, it is known that HSA is synthesised and secreted by the liver. Its primary structure consists of a single chain of 585 amino acid residues. Further, it contains 17 disulfide bridges, one tryptophan, and one free cysteine; 67% of the secondary structure is formed by an α helix of six turns, whereas the three-dimensional structure can be described in terms of three domains, each of them constituted by two subdomains.^[7] Usually, drugs bind primarily to the high-affinity sites, with typical association constants in the range of 10^4 – 10^6 M⁻¹. In addition to the primary sites, lower-affinity sites are often populated. The pioneering work of Sudlow and co-workers, which was based on the displacement of fluorescence probes, revealed that a great number of drugs bind with high affinity to one or two sites, called site I (warfarin binding site) and site II (indole-benzodiazepine binding site).^[8]

BSA is among the most studied and commonly used proteins in biochemical research. BSA and HSA present 76% sequence similarity, but the former contains two Trp residues in-

stead of one. In general, the structural differences observed between both albumins are conservative in nature. For example, hydrophobic amino acids are replaced by other hydrophobic amino acids rather than by polar residues.

Owing to its similarity to HSA, many studies on the drug-protein binding process have used BSA as a model.^[3–5] However, the binding strength of several ligands (naproxen, carprofen, ibuprofen, and others) to the bovine protein has proven to be different from that found for the human protein.^[9–21] Therefore, the development of new tools for the investigation of drug-protein interactions, as well as for the comparison between the binding of drugs to HSA and BSA, seems to be important for the integration of existing knowledge.

In the past, a number of techniques including equilibrium dialysis-HPLC, ultrafiltration, spectrophotometry, fluorimetry, calorimetry, circular dichroism, capillary electrophoresis, and NMR diffusion measurements have been used for drug-protein binding studies.^[22–31] Each of these methods has its own advantages and limitations; most of the limitations are related to sensitivity, interference, diffusion problems or lack of reproducibility arising from a complicated workup.

A possible alternative to these methodologies could be based on the detection of transients by laser flash photolysis (LFP). Because their dynamic properties can be very medium-dependent, triplet excited states have been shown to be ex-

[a] I. Vayá, C. J. Bueno, Dr. M. C. Jiménez, Prof. Dr. M. A. Miranda
Departamento de Química/Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC
Universidad Politécnica de Valencia, camino de Vera s/n, 46022 Valencia
(Spain)
Fax: (+34)-96-387-7809
E-mail: mcjimene@qim.upv.es
mmiranda@qim.upv.es

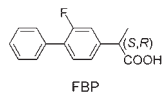
Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.chemmedchem.org> or from the author.

tremely sensitive to their microenvironment.^[32] Hence, these transient species can be regarded as potential reporters for the binding of drugs to serum albumins. From the multiexponential decay kinetics, it could even be possible to analyse the drug distribution among the bulk solution and the different protein binding sites. More interestingly, triplet lifetime measurements would depend on the nature of the drug–HSA complexes, such as the strength of the interaction, conformational restrictions, stereochemical requirements, inhibition of self-quenching or triplet–triplet annihilation, and protection from attack by oxygen or other reagents.

In a recent preliminary communication, we have reported on the suitability of the triplet excited states of (*R*)- and (*S*)-flurbiprofen methyl ester (FBPMe) to obtain relevant information about the binding of this compound to HSA.^[33] The triplet lifetimes (τ_T) of (*R*)- and (*S*)-FBPMe were dramatically enhanced within the HSA microenvironment. Moreover, two different τ_T values were found for the protein-included FBPMe, which were associated with the presence of the drug in two different binding sites. Based on these values, the populations of the two binding sites at different FBPMe/HSA ratios were determined by regression analysis of the triplet decay traces.

In our previous work, FBPMe was used for convenience, as its hydrophobic character favours inclusion within the protein. However, the analogous information obtained from the triplet state of flurbiprofen (FBP), which is the form usually prescribed to patients, would be more relevant for pharmacokinetic purposes.

The nonsteroidal anti-inflammatory drug FBP is a 2-arylpropionic acid. It is prescribed for the relief of mild to moderately



severe pain and inflammation (rheumatoid arthritis, osteoarthritis, tendonitis, bursitis), and also for ophthalmic disorders. Although the pharmacological effect of FBP is mainly due to the *S* enantiomer, it is usually sold as a racemic mixture.^[34] Recently, it has been reported that FBP selectively inhibits the secretion of β -amyloid 42 (A β 42), which is the most toxic component of the senile plaques present in the brain of Alzheimer patients.^[35] Furthermore, it has also been previously established that FBP binds preferentially to site II in HSA, although the lower-affinity binding site I is also populated to some extent.^[36,37]

In the present work, we have undertaken a systematic LFP study on both (*S*)- and (*R*)-FBP in the presence of different amounts of HSA or BSA, by using the well-characterised triplet–triplet absorption of FBP as reporter.^[38] It will be shown that the most significant differences between both albumins are related to dynamic ranges found for the FBP excited state lifetimes within the proteins and to the relative occupancy of the two binding sites.

Results and Discussion

(*S*)-flurbiprofen–SA systems

The behaviour of the *S* enantiomer of FBP was examined first. For the studies in the presence of HSA, a battery of aqueous solutions containing (*S*)-FBP and HSA (molar ratios between 10:1 and 0.3:1) were prepared in neutral buffer (0.01 M PBS) and submitted to LFP. In all cases, the transient absorption spectra obtained after laser excitation ($\lambda_{\text{exc}} = 266$ nm) displayed a maximum at 360 nm, which was assigned to the FBP first triplet excited state.^[38] Remarkably, whereas the decay at 360 nm in the absence of protein followed a first order exponential law with a lifetime of 1.5 μ s, in the presence of HSA it required multiexponential fitting and occurred on longer time-scales (Figure 1).

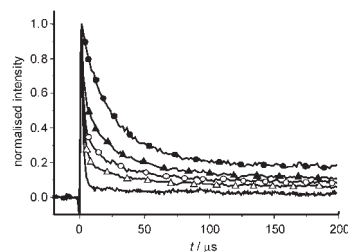


Figure 1. Laser flash photolysis ($\lambda_{\text{exc}} = 266$ nm) of (*S*)-FBP (—) and (*S*)-FBP–HSA at molar ratios of 7.5:1 (Δ), 5.0:1 (\circ), 2.5:1 (\blacktriangle), and 0.7:1 (\bullet). Normalised decays were monitored at 360 nm. The concentration of (*S*)-FBP was 2.5×10^{-5} M in all cases.

Thus, when the (*S*)-FBP/HSA ratio was between 0.7:1 and 0.5:1, a double exponential decay was observed with lifetimes of 11.2 and 35.9 μ s. The negligible contribution of the 1.5 μ s component indicated the absence of free (*S*)-FBP in solution under these conditions. The fact that two different τ_T values were obtained in the presence of HSA correlates well with the existence of two different types of microenvironments (i.e., two different binding sites) in the protein. It is worth mentioning that the protein-bound (*S*)-FBP has considerably longer lifetimes (up to 24-fold) than the noncomplexed form. This can be attributed to a slower deactivation of the excited states inside the HSA binding sites, where an exceptional microenvironment protects the triplet excited state from attack by a second (*S*)-FBP molecule, oxygen, and other reagents. To check this hypothesis, parallel experiments were performed in N_2 - and O_2 -purged solutions of (*S*)-FBP in PBS, both in the absence and in the presence of HSA. In fact, the triplet decay rate increased with increasing oxygen concentration. The decay traces are shown in the Supporting Information (see Figure S5 and S6, pp. S11 and S12), and the rate constants are given in Table 1. Clearly, the quenching process occurs within the protein microenvironment much more slowly than in the bulk so-

Table 1. Rate constants of triplet quenching by oxygen for FBP free, in site I, and site II.

	Microenvironment	$k_q(\text{O}_2)$ [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$]
(S)-FBP	solution	1.0×10^9
(S)-FBP/HSA ^[a]	site I	2.1×10^8
	site II	9.1×10^7
(R)-FBP/HSA ^[a]	site I	2.0×10^8
	site II	3.9×10^7
(S)-FBP/BSA ^[a]	site I	4.0×10^8
	site II	3.4×10^7
(R)-FBP/BSA ^[a]	site I	1.9×10^8
	site II	4.6×10^7

[a] Ratio = 0.7:1.

lution. Moreover, protection from oxygen attack seems to be more effective within the high affinity site II.

At higher (S)-FBP/HSA ratios (from 0.8:1 to 10:1), three lifetime values (1.5, 11.2 and 35.9 μs) were necessary to obtain a good fitting of the decay signal (also shown in Figure 1). This could be associated with the presence of the two (S)-FBP-HSA species ($\tau_1 = 11.2$ and 35.9 μs), in addition to free (S)-FBP ($\tau_1 = 1.5 \mu\text{s}$).

A regression analysis of the decay curves for (S)-FBP/HSA ratios from 10:1 to 0.8:1 allowed us to determine the values of the A_1 , A_2 , and A_3 coefficients (corresponding to the three components with different lifetimes, correlated with free, site-I-bound, and site-II-bound FBP). Based on the fact that the high affinity site of FBP is site II,^[36,37] the major component under nonsaturating conditions (associated with the longest τ_1) was assigned to FBP within site II. Consequently, the minor component (with $\tau_1 = 11.2 \mu\text{s}$) was assigned to site-I-bound FBP. Moreover, to obtain independent evidence supporting this assignment, additional LFP experiments were performed in the presence of (S)-ibuprofen ((S)-IBP) and capric acid (CA), whose affinity for binding in site II is known to be very high.^[39,40] In good agreement with the initial assumptions, the addition of IBP or CA to the (S)-FBP-HSA solutions resulted in a decreased contribution of the longest lifetime component (site-II-bound FBP), with a concomitant enhancement of the components assigned to free-, and site-I-bound FBP. The percentages of free-, site-I-, and site-II-bound FBP in the presence of HSA (and eventually (S)-IBP or CA) are shown in Table 2.

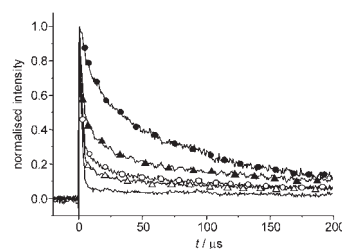
To investigate the behaviour of (S)-FBP in the bovine protein, parallel experiments were carried out in the presence of increasing amounts of BSA. Thus, PBS solutions of (S)-FBP and BSA (molar ratio in the range from 10:1 to 0.3:1) were submitted to LFP. Again, two components with $\tau_1 = 10.8$ and 86.5 μs were obtained for the triplet decay ($\lambda = 360 \text{ nm}$) inside the protein. This is shown in Figure 2.

A regression analysis of the decay curves for (S)-FBP/BSA ratios from 10:1 to 1:1 (where some free drug is present) allowed us to obtain the values of the A_1 , A_2 , and A_3 coefficients. The major component under nonsaturating conditions ($\tau_1 = 86.5 \mu\text{s}$) was assigned to (S)-FBP in the high affinity binding site (site II), while the minor component (with $\tau_1 = 10.8 \mu\text{s}$) was attributed to (S)-FBP within site I. Experiments in the presence

Table 2. Percentage of free, site-I-, and site-II-bound (S)-FBP or (R)-FBP under various conditions.

	Free [%]	Site-I-bound [%]	Site-II-bound [%]
(S)-FBP	100	–	–
(S)-FBP/HSA ^[a]	0	40	60
(S)-FBP/HSA/(S)-IBP ^[b]	27	65	8
(S)-FBP/HSA/CA ^[b]	29	59	12
(S)-FBP/BSA ^[a]	0	39	61
(S)-FBP/BSA/(S)-IBP ^[b]	8	58	34
(S)-FBP/BSA/CA ^[b]	5	57	38
(R)-FBP/HSA ^[a]	0	30	70
(R)-FBP/HSA/(S)-IBP ^[b]	22	59	19
(R)-FBP/HSA/CA ^[b]	26	61	13
(R)-FBP/BSA ^[a]	0	33	67
(R)-FBP/BSA/(S)-IBP ^[b]	0	56	44
(R)-FBP/BSA/CA ^[b]	0	50	50

[a] Ratio = 0.7:1. [b] Ratio = 0.7:1:1.

**Figure 2.** Laser flash photolysis ($\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$) of (S)-FBP (—) and (S)-FBP-BSA at molar ratios of 7.5:1 (\square), 5.0:1 (\circ), 2.5:1 (\blacktriangle), and 0.7:1 (\bullet). Normalised decays were monitored at 360 nm. The concentration of (S)-FBP was $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ in all cases.

of (S)-IBP or CA supported this assumption. Relevant data are shown in Table 2.

It is remarkable that the triplet excited state of site-II-bound (S)-FBP lived much longer (2.4 times) within BSA than within HSA. However, no significant differences were found in the corresponding values of the site-I-bound (S)-FBP. The results indicate that the triplet excited state of (S)-FBP is more protected from deactivation (due to attack by a second (S)-FBP molecule, oxygen, or other reagents) within the microenvironment provided by site II in BSA. Furthermore, this site appears to bind (S)-FBP with the highest affinity, as supported by the fact that replacement of (S)-FBP is more difficult here than in the other SA microenvironments. Accordingly, triplet quenching by oxygen was slower inside the protein, especially in site II (see Table 1 and supporting information, Figure S5 and S7, pp. S11 and S13).

Further, the A coefficients of the regression analysis curves indicate that the main differences between the behaviour of the two proteins were found at low (S)-FBP/SA ratios. This is shown in Figure 3; further plots illustrating the binding behav-

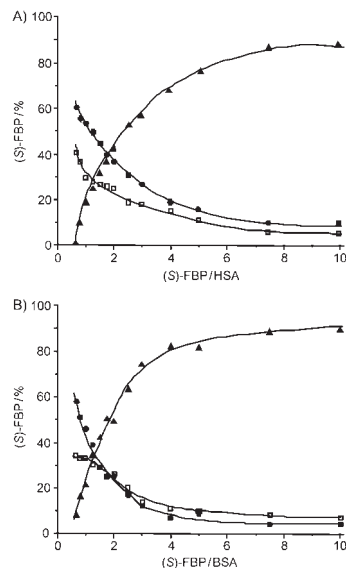


Figure 3. A) Percentage of free (\blacktriangle), site-I (\square), and site-II-bound (\bullet) (S)-FBP in the presence of HSA at different (S)-FBP/HSA ratios. B) Percentage of free (\blacktriangle), site-I (\square), and site-II-bound (\bullet) (S)-FBP in the presence of BSA at different (S)-FBP/BSA ratios.

our can be found in the supporting information, Figure S10 and S11, pp. S16 and S17.

(R)-flurbiprofen/SA systems

As stated above, the pharmacological effect of flurbiprofen is mainly attributed to the *S* enantiomer, although the drug is sold for therapeutic purposes as a racemic mixture. To check whether significant differences in the binding behaviour were observable for the two enantiomers, a similar study was performed on (R)-FBP in the presence of both serum albumins.

As expected, in PBS solution the transient absorption spectra and the triplet lifetimes of the two FBP enantiomers did not differ from each other. When included within HSA, two components with τ_T 10.2 μs and 39.0 μs were found for (R)-FBP. These values were only slightly different from those obtained for (S)-FBP, which indicates very modest stereoselectivity in the HSA binding process. Representative decays of the signal, which was monitored at 360 nm, are shown in Figure 4.

As in the case of (S)-FBP, LFP experiments for the (R)-FBP/HSA systems in the presence of (S)-IBP or CA supported the initial site I and site II assignments. Thus, addition of (S)-IBP or CP to the (R)-FBP/HSA solutions resulted in a dramatic decrease in the amount of site-II-bound (R)-FBP (up to 5.8 times lower),

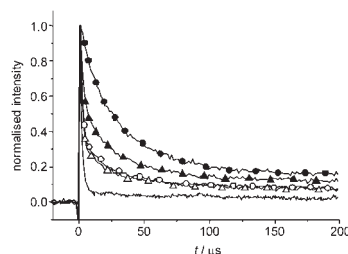


Figure 4. Laser flash photolysis (λ_{exc} = 266 nm) of (R)-FBP (—) and (R)-FBP-HSA at molar ratios of 7.5:1 (\triangle), 5.0:1 (\square), 2.5:1 (\blacktriangle), and 0.7:1 (\bullet). Normalised decays were monitored at 360 nm. The concentration of (R)-FBP was 2.5×10^{-5} M in all cases.

with a parallel enhancement of the free and site-I-bound species (significant data are shown in Table 2).

Finally, similar studies were carried out for (R)-FBP in the presence of the bovine protein. From the LFP kinetic decays of the (R)-FBP-BSA solutions (Figure 5), two values of τ_T (6.6 and 58.6 μs) were obtained and attributed to site-I-bound and site-II-bound (R)-FBP, respectively. Oxygen quenching experiments led to results similar to those obtained with (S)-FBP (Table 1 and supporting information, Figure S8 and S9, pp. S14 and S15).

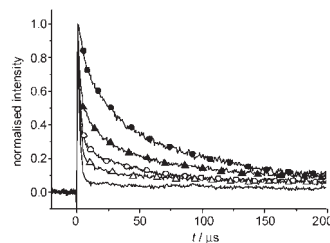


Figure 5. Laser flash photolysis (λ_{exc} = 266 nm) of (R)-FBP (—) and (R)-FBP-BSA at molar ratios of 7.5:1 (\triangle), 5.0:1 (\square), 2.5:1 (\blacktriangle), and 0.7:1 (\bullet). Normalised decays were monitored at 360 nm. The concentration of (R)-FBP was 2.5×10^{-5} M in all cases.

On the other hand, the addition of (S)-IBP or CA to the (R)-FBP-BSA solutions resulted in a redistribution of the bound drug (Table 2), which partially moved from site II to site I. Interestingly, no detectable amounts of free drug were found under these conditions.

The site occupancy, which was estimated from the *A* coefficients of the regression analysis curves, are shown in Figure 6. The main differences between the behaviour of the two proteins were found again at low (S)-FBP/SA ratios.

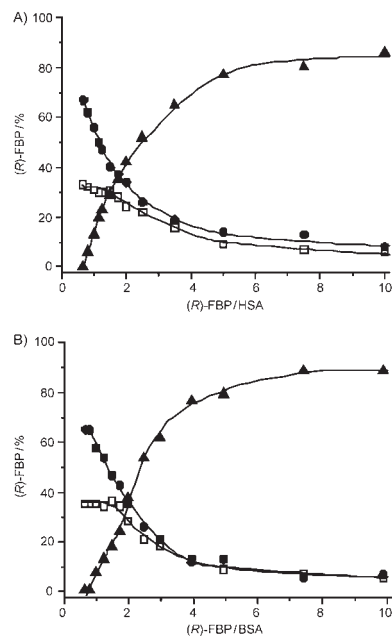


Figure 6. A) Percentage of free (\blacktriangle), site-I (\square), and site-II-bound (\bullet) (*R*)-FBP in the presence of HSA at different (*R*)-FBP/HSA ratios. B) Percentage of free (\blacktriangle), site-I (\square), and site-II-bound (\bullet) (*R*)-FBP in the presence of BSA at different (*R*)-FBP/BSA ratios.

A comparison between the decays monitored at 360 nm for (S)-FBP–HSA, (S)-FBP–BSA, (R)-FBP–HSA, and (R)-FBP–BSA is shown in Figure 7. It clearly shows that the binding behaviour of FBP is different in the two proteins. Moreover, some stereoselectivity occurs in BSA, whereas no significant differences between the two FBP enantiomers were observed within HSA.

Conclusions

The results obtained in the present work confirm that the triplet drug excited states can be used as reporters for the micro-environments experienced within the binding sites of transport proteins. Regression analysis of triplet decays can provide valuable information on the degree of protection from attack by a second drug molecule, oxygen or other reagents, which is afforded these excited states by the protein. The multiexponential fitting of these decays can be satisfactorily correlated with the distribution of the drug among the two binding sites and its presence as the noncomplexed form in the bulk solution. This assignment has been confirmed by using selective site II replacement probes. Both triplet lifetimes and site occupancy

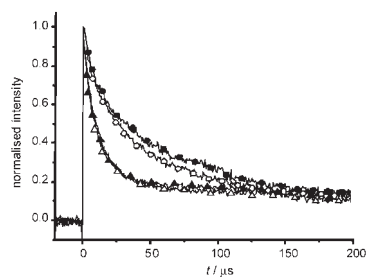


Figure 7. Decays monitored at 360 nm which were obtained upon laser flash photolysis ($\lambda_{exc} = 266$ nm; 0.01 M PBS, air) of (S)-FBP/BSA (\bullet), (R)-FBP/BSA (\circ), (S)-FBP/HSA (\blacktriangle), and (R)-FBP/HSA (\triangle). The drug/SA ratio was kept constant at 0.7:1.

are sensitive to the type of serum albumin employed (human vs. bovine). Finally, less stereoselectivity has been found in the binding behaviour of (S)- and (R)-FBP than in the case of their methyl esters.

Experimental Section

Materials: HSA and BSA were purchased from Sigma. (S)- and (R)-FBP were obtained from Aldrich. The absorbance of the solutions was measured in a Perkin–Elmer Lambda 35 UV/Vis spectrometer.

Laser flash photolysis experiments: Laser flash photolysis experiments were performed by using a Q-switched Nd:YAG laser (Quanta Brilliant, 266 nm, 14 mJ pulse⁻¹, 5 ns fwhm) coupled to a mLF-111 Luzchem miniaturised equipment. All transient spectra were recorded employing 10 × 10 mm² quartz cells with 4 mL capacity. The absorbance of FBP was found to be ≈ 0.2 at the laser wavelength, which corresponds to a concentration of 2.5×10^{-5} M. The concentration of SA was determined with the molar absorption coefficients at 280 nm of 35 700 M⁻¹cm⁻¹ for HSA, and 44 720 M⁻¹cm⁻¹ for BSA. All of the experiments were carried out in PBS (pH 7.4, 0.01 M) at room temperature (22 °C) and under an air atmosphere.

For the studies in the presence of SA, a battery of aqueous solutions containing (S)- or (R)-FBP and SA (molar ratios between 10:1 and 0.3:1) were prepared in neutral buffer (0.01 M PBS) and stored for 15 h at 4 °C to ensure a complete equilibrium between the drug and the protein. As an example, the experimental procedure to prepare a solution containing FBP and SA in 10:1 molar ratio is briefly described. To a 2.5×10^{-5} M solution of (S)- or (R)-FBP (20 mL) in PBS was added 2×10^{-3} M SA (25 μ L) in PBS. The resulting solution (4 mL) was placed in a quartz cuvette and submitted to LFP (10 shots for monitoring at 360 nm). To obtain an accurate decay trace, this experiment was repeated at least three times with fresh sample. Triplet lifetimes and fittings of the decay traces were coincident within the experimental error margins. To obtain the transient absorption spectra from 700 to 290 nm, a fresh sample (drug and protein concentration 2.5×10^{-5} M) was submitted to LFP at a regular interval of 10 nm (10 shots per wavelength). A total of 41 decays for each spectrum acquisition was measured.

Acknowledgements

Financial support from the MCYT (CTQ2004-03811) and the Generalitat Valenciana (GV06/099) is gratefully acknowledged. I.V. and C.J.B. thank "Ministerio de Educación y Ciencia" for a fellowship.

Keywords: binding sites · flurbiprofen · laser flash photolysis · serum albumins

- [1] T. Peters, *All About Albumins: Biochemistry Genetics and Medical Applications*, Academic Press, San Diego, 1995.
- [2] D. C. Carter, J. X. Ho in *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 45, Academic Press, New York, 1994, pp. 152–203.
- [3] B. X. Li, Z. J. Zhang, L. X. Zhao, *Anal. Chim. Acta* 2002, 468, 65.
- [4] T. C. Kwings, *Clin. Chim. Acta* 1985, 151, 193.
- [5] C. K. Svenson, M. N. Woodruff, J. G. Baxter, D. Lalka, *Clin. Pharmacokinet.* 1985, 11, 450.
- [6] T. Peters, *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 37, Academic Press, New York, 1985.
- [7] X. M. He, D. C. Carter, *Nature* 1992, 358, 209.
- [8] G. Sudlow, D. J. Birkett, D. N. Wade, *Mol. Pharmacol.* 1975, 11, 824.
- [9] P. Sun, A. Hoops, R. A. Hartwick, *J. Chromatogr. B* 1994, 661, 335.
- [10] J. B. Whitlam, M. J. Crooks, K. F. Brown, P. V. Pedersen, *Biochem. Pharmacol.* 1979, 28, 675.
- [11] S. Wei, L. Zhao, X. Cheng, J.-M. Lin, *Anal. Chim. Acta* 2005, 545, 65.
- [12] H. Kohita, Y. Matsushita, I. Moriguchi, *Chem. Pharm. Bull.* 1994, 42, 937.
- [13] E. L. Gelamo, C. H. T. P. Silva, H. Imasato, M. Tabak, *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1594, 84.
- [14] E. L. Gelamo, M. Tabak, *Spectrochim. Acta Part A* 2000, 56, 2255.
- [15] F. Fleury, I. Kudelina, I. Nabiew, *FEBS Lett.* 1997, 406, 151.
- [16] K. R. Kuchimanchi, M. S. Ahmed, T. P. Johnston, A. K. Mitra, *J. Pharm. Sci.* 2001, 90, 659.
- [17] D. Silva, C. Cortez, S. R. W. Louro, *Spectrochim. Acta Part A* 2004, 60, 1215.
- [18] G. N. Valsami, M. Panayotis, M. A. Koupparis, *Pharm. Res.* 1991, 8, 888.
- [19] W. E. Muller, U. Wollert, *Biochem. Pharmacol.* 1976, 25, 141.
- [20] K. Kitamura, M. Kume, M. Yamamoto, S. Takegami, T. Kitade, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004, 36, 411.
- [21] A. Sulkowska, *J. Mol. Struct.* 2002, 614, 227.
- [22] Z. Jia, T. Ramstad, M. Zhong, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 30, 405.
- [23] L. H. Lucas, K. E. Price, C. K. Larive, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 14258.
- [24] R. Zini, D. Morin, P. Jouenne, J. P. Tillement, *Life Sci.* 1988, 43, 2103.
- [25] J. Barne, J. M. Chamouard, G. Houin, J. P. Tillement, *Clin. Chem.* 1985, 31, 60.
- [26] W. F. Bowers, S. Fulton, J. Thompson, *Clin. Pharmacokinet.* 1984, 9, 49.
- [27] H. Aki, M. Yamamoto, *J. Pharm. Pharmacol.* 1989, 41, 674.
- [28] H. H. Parikh, K. McElwaine, V. Balasubramanian, W. Leung, D. Won, M. E. Morris, M. Ramanathan, *Pharm. Res.* 2000, 17, 632.
- [29] A. Frostell-Karlsson, A. Remaeus, H. Roos, K. Andersson, P. Borg, M. Hämläinen, R. Karlsson, *J. Med. Chem.* 2000, 43, 1986.
- [30] A. Shibukawa, Y. Kuroda, T. Nakagawa, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1999, 18, 1047.
- [31] Y. H. Chu, L. Z. Avila, H. A. Biebuyck, G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.* 1992, 35, 2915.
- [32] C. Bohne, M. Barra, R. Boch, E. B. Abuin, J. C. Scaiano, *J. Photochem. Photobiol. A* 1992, 65, 249.
- [33] M. C. Jiménez, M. A. Miranda, I. Vayá, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 10134.
- [34] A. M. Evans, *J. Clin. Pharmacol.* 1996, 36, 75.
- [35] I. Peretto, S. Radaelli, C. Parini, M. Zandi, L. F. Raveglia, G. Dondio, L. Fontanella, P. Misiano, C. Bigogno, A. Rizzi, B. Riccardi, M. Bisciaoli, S. Marchetti, P. Puccini, S. Catinella, I. Rondelli, V. Cenacchi, P. T. Bolzoni, P. Caruso, G. Villetti, F. Facchinetti, E. Del Giudice, N. Moretto, B. P. Imbimbo, *J. Med. Chem.* 2005, 48, 5705.
- [36] J. Ostergaard, C. Schou, C. Larsen, N. H. H. Heegaard, *Anal. Chem.* 2003, 75, 207.
- [37] L. Deschamps-Labat, F. Pêhourcq, M. Jagou, B. Bannwarth, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1997, 16, 223.
- [38] M. C. Jiménez, M. A. Miranda, R. Tormos, I. Vayá, *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004, 3, 1038.
- [39] T. Itoh, Y. Saura, Y. Tsuda, H. Yamada, *Chirality* 1997, 9, 643.
- [40] G. Menke, W. Wörner, W. Kratzer, N. Rietbrock, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1989, 339, 42.

Received: March 8, 2006
Revised: May 19, 2006
Published online on August 11, 2006

