



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE  
TECNOLOGÍA  
QUÍMICA



EXCELENCIA  
SEVERO  
OCHOA

07/2013-06/2017  
07/2017-06/2021  
2023-2026

---

# FOTORREACTIVIDAD DE GEFITINIB Y SUS METABOLITOS FENÓLICOS EN DISOLUCIÓN Y EN PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS

---

Programa de doctorado en química  
Departamento de química (UPV)  
Instituto de tecnología química (UPV / CSIC)

**Lorena Tamarit Mayo**

Tesis doctoral dirigida por:

Dr. Ignacio Vayá Pérez

Dra. Inmaculada Andreu Ros

Valencia, marzo 2024





UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

D. IGNACIO VAYÁ PÉREZ, profesor titular de la Universitat Politècnica València, y Dña. INMACULADA ANDREU ROS, profesora titular de la Universitat Politècnica València.

CERTIFICAN:

Que la presente tesis doctoral, titulada: "Fotorreactividad de gefitinib y sus metabolitos fenólicos en disolución y en proteínas transportadoras" ha sido desarrollada por LORENA TAMARIT MAYO bajo su dirección, en el Departamento de Química de la Universitat Politècnica de València y en el Instituto Mixto de Tecnología Química (UPV-CSIC) de la Universitat Politècnica de València, para optar al grado de doctor en Química por la Universitat Politècnica de València.

Fdo. D. Ignacio Vayá Pérez

Fdo. Inmaculada Andreu Ros





## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer enormemente al Dr. Ignacio Vayá y a la Dra. Inmaculada Andreu Ros por haberme dado la oportunidad de poder desarrollar esta tesis doctoral junto a ellos.

A Nacho, porque hace años que comencé mi trabajo final de máster contigo como tutor y, desde entonces, he aprendido muchísimas cosas sobre fotofísica y fotoquímica, pero también sobre cómo ser un buen investigador, cuidando los detalles al máximo y sin perder la curiosidad ni las ganas de estudiar y comprenderlo todo minuciosamente. Muchísimas gracias por todas las oportunidades, la paciencia y la confianza que has puesto en mí.

A Inma porque, aunque oficialmente hemos coincidido más tarde, desde mucho antes has estado siempre disponible y tendiéndome la mano para apoyarme en todo, mostrando siempre una cara muy humana y cercana. Gracias por tu predisposición, tus consejos, y por darme la oportunidad, entre otras, de aprender tanto de un mundo que hasta hace poco me era totalmente desconocido como es la fotobiología.

Por supuesto, esta etapa no habría sido lo mismo sin todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio, que no son pocos. Desde el Departamento de Química hasta el IIS La Fe, pasando por el ITQ, son muchísimas las personas que han dejado una huellita en mí y que no voy a olvidar nunca, incluso a los que ya no están en el mundillo como Vicky y Óscar, que estuvieron en mis inicios. Mery y Alejandro, el tándem de La Fe, os debo lo inimaginable por toda la ayuda que me habéis prestado en los días en los que me encontraba tan perdida con protocolos totalmente nuevos para mí. Y a los chicos del Lab2.2 (también a los del

lab de al lado), que siempre llegan tarde al *Almuerzo?* Jorge C., Dani, Angie, Ainhoa, Celia, Antón, Juanjo, Inés, Maykel... con vosotros esta etapa ha sido más llevadera y amena, tanto dentro como fuera del laboratorio. Por petición popular, para Dani: "Quiero expresar mi agradecimiento hacia ti, mi compañero de laboratorio, por tu presencia durante este proceso. Aunque nuestras contribuciones han sido distintas, valoro tu compañía en el laboratorio. Gracias por formar parte de este trayecto académico." Dijo una vez una IA.

Alejandro, contigo son ya 12 años desde que nos conocimos, casi nada. Gracias por estar siempre ahí, por todos los buenos momentos que hemos compartido en el laboratorio, por los cotilleos y risas, y también por los momentos de mandarlo todo *a fer la mà*, aunque luego siempre hemos seguido luchando por llegar hasta el final.

De manera especial quiero agradecerles a Jorge H. y a Arianna todo lo que me han aportado durante esta etapa, tanto a nivel investigador como personal. Vosotros sois dos personas a las que tener como referentes en lo profesional y en lo personal. Porque sois luz, bondad, generosidad, alegría, confianza y sabiduría, y mucha. Y porque Arianna, eres mi media pera y aunque estés a kilómetros de distancia siempre me voy a acordar de ti cada vez que me mire la muñeca. Pero vuelve pronto, porfa.

Si me salgo de los laboratorios también tengo mucho que agradecer, empezando por mi hermana elegida, Gemma. Qué suerte que la vida nos juntara hace ya 12 años, aunque más suerte tengo de saber que los años que nos quedan por delante son muchos más. Gracias por el grandísimo apoyo que me das, por estar absolutamente siempre ahí, en las buenas y

en las malas, y por ser tan tú y confiar tanto en mí. Te quiero mucho, ya sabes. Y gracias por poner en mi vida a Jonny, porque, aunque a veces nos peleemos como críos e incluso tú te lleves la peor parte, se le quiere mucho, mucho.

Gracias a la vida por entrar en ESN y poner en mi vida a gente tan bonita como las pichurritas, que son zona de confort. O a Rafa, y con él a Alba y a Laia, mi pequeñita ahijada (aunque pronto no lo será tanto).

De otras tierras no puedo olvidarme de Berta, que por casualidades de la vida nos conocimos pero que, de nuevo en la distancia, es una de las personas a las que más quiero. Compañera de festivales y bolso de confesiones y dramas, gracias por todas las escuchas, por enseñarme a ser mejor persona y compartir tus valores tan inquebrantables como bonitos.

A Víctor, porque has llegado a mi vida probablemente en la peor etapa que he tenido hasta ahora, pero tu paciencia, apoyo y amor incondicional me han ayudado a seguir adelante y ver que puedo con todo. Te quiero mucho.

Por último, quiero agradecer a mi familia. En especial, a mis padres Vicente y Elisa, que me lo han dado absolutamente todo, y que me siguen empujando a conseguir nuevos logros impensables para mí, pero alcanzables gracias a ellos. Sois lo mejor que tengo y os quiero mucho, tengo mucha suerte de teneros. Y también a mi hermano Adrián, siempre con las mismas ganas de abrazarnos que de hacernos la puñeta, pero todo con mucho amor. Gracias por ser tan bueno, generoso y transparente.

En fin, aunque no lo parezca me dejo mucha gente fuera de estas líneas (mi tía Mari, mis abuelas, mis compañeros de Palau, las amigas y amigos que me dio ESN...), pero ya me he extendido más de lo que pensaba. En resumen, gracias a toda la gente que está en mi vida, porque de todos aprendo y me ayudan a crecer, convirtiéndome en la persona que soy hoy en día.

Por último, los que me conocen saben que soy una amante de la música y más concretamente de la música *indie*, así que dejo aquí un *mix* de frases de canciones que me encantan de mis grupos favoritos con las que pretendo reflejar cómo ha sido este largo viaje que es el doctorado: En los momentos en los que piensas "qué vida tan dura", recuerda: "no pierdas esa fé, que hoy es eterna". Porque "ser valiente no es solo cuestión de suerte", y la vida está llena de oportunidades como "*a sky full of stars*". Sólo se trata de buscarlas y afrontarlas como si se tratase de "ese instante en el que la montaña rusa llega arriba" con confianza e ilusión. Y después: "a brillar, que son sílabas".

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A	absorbancia
Ac	aceptor
Ac*	aceptor en el estado excitado
Ac <sup>-•</sup>	radical anión del aceptor
AcH <sup>+</sup>	aceptor protonado
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	adenosín difosfato
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosín trifosfato
c	velocidad de la luz en el vacío
C	término culómbico
C-Hex	ciclohexano
D	dador
D <sup>-</sup>	anión del dador
D*	dador en su estado excitado
D <sup>+•</sup>	radical catión del dador
$\Delta A$	incremento de absorbancia
$\Delta G$	incremento de energía libre de Gibbs
DH	dador con un átomo de hidrógeno
DH*	dador con un átomo de hidrógeno en su estado excitado
Diox	1,4-dioxano
DMSO	dimetilsulfóxido
E <sub>0-0</sub>	energía en el estado fundamental
EGF	factor de crecimiento epidérmico

EGFR	receptor del factor de crecimiento epidérmico
$E_{\text{ox}}$	potencial de oxidación
$E_{\text{red}}$	potencial de reducción
$E_S$	energía de singlete
ESPT	transferencia de protón fotoinducida
eT	transferencia electrónica
$E_T$	energía de triplete
ET	transferencia de energía
EtOH	etanol
EXC	excipiejo
F	fluorescencia
$\phi(^1\text{O}_2)$	rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete
FDA	administración de alimentos y medicamentos
$\phi_F$	rendimiento cuántico de fluorescencia
FS	fotosensibilizador
$^1\text{FS}^*$	estado excitado singlete del fotosensibilizador
$^3\text{FS}^*$	estado excitado triplete del fotosensibilizador
FSK	fibroblastos de piel humana
FTA	absorción transitoria a escala de femtosegundo
fwhm	ancho de banda a la mitad de la intensidad máxima
GFT	gefitinib
$^1\text{GFT}^*$	estado excitado singlete de gefitinib
$^3\text{GFT}^*$	estado excitado triplete de gefitinib
GFT-M1	metabolito 1 de gefitinib ( <i>O</i> -desmorfolinopropil gefitinib)
$^1\text{GFT-M1}^*$	estado excitado singlete de metabolito 1 de gefitinib
$^3\text{GFT-M1}^*$	estado excitado triplete de metabolito 1 de gefitinib

GFT-M2	metabolito 2 de gefitinib ( <i>O</i> -desmetil gefitinib)
<sup>1</sup> GFT-M2*	estado excitado singlete de metabolito 2 de gefitinib
<sup>3</sup> GFT-M2*	estado excitado triplete de metabolito 2 de gefitinib
HaCaT	queratinocitos humanos
HAG	$\alpha_1$ -glicoproteína ácida de origen humano
HER1/2/3/4	familia de genes del receptor del factor de crecimiento epidérmico
HOMO	orbital molecular ocupado de mayor energía
HSA	albúmina sérica humana
IBP	ibuprofeno
IC	conversión interna
ICT	complejo de transferencia de carga intramolecular
$I_F$	intensidad de fluorescencia
ILD	enfermedad intersticial de pulmón
IMT	imatinib
ISC	cruce intersistemas
$K_B$	constante de unión a la proteína
$K_Q$	constante de desactivación
LAP	lapatinib
LE	estado excitado localizado
LFP	fotólisis de destello láser
LUMO	orbital molecular desocupado de menor energía
MAP	2-metoxiacetofenona
MD	simulaciones de dinámica molecular
MeCN	acetonitrilo
3Me-Indol	3-metilindol
NAc-TrpMe	éster metílico del <i>N</i> -acetil-triptófano

NAc-TyrMe	éster metílico de la <i>N</i> -acetil-tirosina
NIR	emisión cercana al infrarrojo
<i>N</i> -LAP	lapatinib desalquilado en la posición <i>N</i> -
NPX	naproxeno
NRU	ensayo de captación de rojo neutro
NSAIDs	fármacos antiinflamatorios no esteroideos
NSCLC	cáncer de pulmón no microcítico
$^1\text{O}_2$	oxígeno singlete
<i>O</i> -LAP	lapatinib desalquilado en la posición <i>O</i> -
OMS	organización mundial de la salud
P	fósforo
PBS	disolución tampón fosfato
Ph	fosforescencia
pT	transferencia de protón
rmsd	análisis de la raíz de la desviación cuadrática media
ROS	especies reactivas de oxígeno
$S_0$	estado fundamental
$S_1$	primer estado excitado singlete
$S_n$	estado excitado singlete superior a $S_1$
$T_1$	primer estado excitado triplete
$\tau_f$	tiempo de vida media de fluorescencia
TKI	inhibidor de la tirosina quinasa
Tol	tolueno
Trp	triptófano
$\tau_T$	tiempo de vida media de triplete
TTET	transferencia de energía triplete-triplete



Tyr	tirosina
Tyr·	radical tirosina
u. a.	unidades arbitrarias
UV	ultravioleta
UV-A	ultravioleta A
UV-B	ultravioleta B
UV-C	ultravioleta C
VR	relajación vibracional
WRF	warfarina



## RESUMEN

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

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

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

Seguidamente, se investigó el comportamiento fotofísico del fármaco y de sus metabolitos en medio biológico, utilizando para ello dos de las proteínas transportadoras más importantes y abundantes en el torrente sanguíneo, como son la albúmina sérica y la  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida, ambas de origen humano (HSA y HAG, respectivamente). En general, se observó un gran aumento de la emisión del fármaco y de sus metabolitos unidos a la proteína en comparación con la fluorescencia detectada cuando están libres en disolución acuosa. Dicho aumento viene dado como consecuencia de las restricciones en el interior de la proteína para que se dé la relajación conformacional de GFT y de sus metabolitos. En relación a las interacciones con la proteína, se observaron grandes diferencias en el comportamiento fotofísico de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en el interior de éstas. Así, para GFT@proteína se observó únicamente la formación de estados excitados LE; a partir de estos puede tener lugar un proceso de transferencia electrónica desde el triptófano o la tirosina presentes en la cavidad de la proteína a  $LE^{-1}GFT^*$ . Sin embargo, en el caso de GFT-M1@HSA, se reveló un proceso de transferencia de protón fotoinducida para formar especies de tipo fenolato en el estado excitado. No obstante, este proceso tiene mucha menos importancia en los complejos GFT-M1@HAG, donde se observó mayoritariamente emisión desde estados LE. Por el contrario, la excitación de GFT-M2@HSA genera principalmente estados LE, mientras que para GFT-M2@HAG se forman en mayor medida especies tipo fenolato. Cabe destacar que en el interior de la proteína no se detectó la formación de estados excitados triplete en ningún caso, lo cual tiene implicaciones biológicas puesto que el mecanismo de fototoxicidad asociado al fármaco y a sus metabolitos ha de ser únicamente de tipo I.

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

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

## RESUM

Els inhibidors de la tirosina quinasa (TKIs) constitueixen un dels tractaments contra el càncer més utilitzats en les últimes dècades. Els TKIs presenten grans avantatges enfront de teràpies més clàssiques (*i. e.* quimioteràpia, radioteràpia) per tindre una elevada selectivitat, ja que únicament es dirigeixen a les cèl·lules canceroses bloquejant l'activitat tirosina quinasa, i, per tant, inhibint el creixement descontrolat i la consegüent aparició de tumors. No obstant això, estos fàrmacs poden generar dany a les principals dianes moleculars (ADN, lípids i proteïnes) després d'absorbir llum solar, provocant reaccions de fotosensibilització les quals es manifesten en forma de lesions cutànies, fotodermatosi i, en última instància, desenvolupant càncer de pell. A pesar que molts fàrmacs d'aquesta família contenen un cromòfor en la seua estructura que els permet absorbir llum i, per tant, podrien generar reaccions de fotosensibilització, existixen pocs estudis sobre el mecanisme de reacció associat. Així, el nostre grup va investigar els mecanismes moleculars tant químics com biològics de dos TKIs, imatinib (IMT) i lapatinib (LAP). Aquestos estudis mostren com conèixer la fotorreactivitat del fàrmac en un entorn biològic és clau per a entendre els mecanismes pels quals es genera el dany fotoinduit. A més, es va establir una correlació directa entre el comportament fotofísic de LAP i dels seus principals metabòlits amb el dany fotobiològic que generen. En aquestos estudis es van utilitzar diferents tècniques espectroscòpiques com són la fluorescència i l'absorció transitòria, les quals són de gran utilitat per ser altament sensibles, ja que permeten detectar espècies transitòries que podrien ser les responsables del potencial fototòxic.

Amb estos antecedents, i havent estudiat recentment la foto(geno)toxicitat que pot provocar el TKI gefitinib (GFT) i els seus principals metabòlits fotoactius (GFT-M1 i GFT-M2), s'ha decidit dur a terme un estudi complet sobre la fotorreactivitat d'estos, tant en dissolució com al medi proteic. A més, també s'ha estudiat la unió lligant@proteïna, així com les principals interaccions i processos que tenen lloc en el complex supramolecular després de l'absorció de llum UV-A, amb l'objectiu final de poder entendre els mecanismes moleculars responsables del dany fotoinduït a biomolècules.

En primer lloc, s'han estudiat les propietats fotofísiques de GFT, GFT-M1 i GFT-M2 en dissolució orgànica, utilitzant dissolvents de diferents polaritats. D'esta manera, s'han caracteritzat les principals espècies transitòries formades, així com els processos fotoinduïts que tenen lloc després d'excitar amb llum UV-A en dissolució. En general, tant per al fàrmac com per als metabòlits, es va observar una forta dependència de les propietats fotofísiques amb la polaritat del medi. Així, en dissolvents apolars es formen principalment estats excitats localitzats (LE) de naturalesa singlet, els quals són els precursors directes dels estats excitats triplet. No obstant això, en medi més polar, inicialment es formen estats LE, els quals evolucionen molt ràpidament cap a la formació d'estats de transferència de càrrega intramolecular (ICT), que posteriorment formaran estats excitats triplet. Estos últims es van caracteritzar completament mitjançant diferents experiments fotofísics com la desactivació per oxigen molecular o la fotosensibilització amb dadors o acceptors adequats.

Seguidament, es va investigar el comportament fotofísic del fàrmac i dels seus metabòlits al medi biològic, utilitzant per a això dos de les proteïnes



transportadores més importants i abundants en el torrent sanguini: l'albumina sèrica humana i la  $\alpha_1$ -glicoproteïna àcida humana (HSA i HAG, respectivament). En general, es va observar un gran augment de l'emissió del fàrmac i dels seus metabòlits units a la proteïna comparada amb la fluorescència detectada quan estan lliures en dissolució aquosa; este augment ve donat com a conseqüència de les restriccions generades a l'interior de la proteïna perquè es done la relaxació vibracional. En relació a les interaccions amb la proteïna, es van observar grans diferències en el comportament fotofísic de GFT, GFT-M1 i GFT-M2 a l'interior d'estes. Així, per a GFT@proteïna es va observar únicament la formació d'estats excitats LE; a partir d'estos pot tindre lloc un procés de transferència electrònica des del triptòfan o la tirosina presents en la cavitat de la proteïna a LE-<sup>1</sup>GFT\*. En canvi, per a GFT-M1@HSA es va revelar un procés de transferència de protó fotoinduïda per a formar espècies de tipus fenolato en l'estat excitat. No obstant això, aquest procés té molta menys importància en els complexos GFT-M1@HAG, on es va observar majoritàriament emissió des d'estats LE. Per contra, l'excitació de GFT-M2@HSA genera principalment estats LE, mentres que per a GFT-M2@HAG es formen en major grau espècies tipus fenolato. Cal destacar que a l'interior de la proteïna no es va detectar la formació d'estats excitats triplet, la qual cosa té implicacions biològiques perquè el mecanisme de fototoxicitat associat al fàrmac i als seus metabòlits hauria de ser únicament de tipus I.

Estudis addicionals mitjançant espectroscòpia de fluorescència i modelització molecular, van permetre conèixer amb detall el lloc d'unió preferent del fàrmac i dels seus metabòlits en les proteïnes, així com la conformació adoptada i les interaccions amb els aminoàcids. Així, a

l'interior de HSA, es va observar que el lloc d'unió preferent per a GFT, GFT-M1 i GFT-M2 és el lloc 3. A més, es van calcular les constants d'unió ( $K_B$ ) dels tres lligants per a totes dues proteïnes, obtenint-se valors similars entre si. Quant a les interaccions amb els aminoàcids del lloc d'unió 3, es van observar comportaments diferents per als tres compostos. Com que GFT-M1 és un fenol, pot formar ponts d'hidrogen amb la valina 116, la qual cosa possibilita l'existència de processos de transferència de protó fotoinduïda i, per tant, la generació d'espècies tipus fenolato. Per contra, a pesar que GFT-M2 també és un fenol, este interacciona amb HSA d'una manera diferent, impeding que es formen espècies fenolato i afavorint la formació d'estats LE. No obstant això, en HAG ocorre el contrari; així, GFT-M2 s'orienta de manera que el fenol interacciona formant un pont d'hidrogen amb la histidina 97, permetent la transferència de protó fotoinduïda i, per tant, la generació d'espècies tipus fenolato.

Per tant, s'ha aconseguit estudiar i entendre el comportament fotofísic de GFT i dels seus metabòlits fenòlics en dissolució orgànica i a l'interior de les proteïnes transportadores HSA i HAG. A més, s'han caracteritzat completament les espècies transitòries generades i descrit detalladament els processos que ocorren després de la interacció de GFT, GFT-M1 i GFT-M2 amb llum UV-A, podent-se així establir una correlació entre el comportament fotofísic observat i el potencial fototòxic dels tres compostos estudiats.

## SUMMARY

Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) are one of the most commonly used cancer treatments in recent decades; they have significant advantages over more traditional therapies (*i.e.* chemotherapy, radiotherapy) due to their high selectivity, as target only cancer cells. Their mode of action involves blocking tyrosine kinase activity and thus preventing uncontrolled growth and the subsequent appearance of tumours. However, by absorbing sunlight, these drugs can induce damage to key molecular targets (DNA, lipids and proteins), leading to photosensitivity reactions that may manifest as skin lesions, photodermatoses, and ultimately the development of skin cancer. Although many drugs in this family contain a chromophore in their structure that allows them to absorb light and, therefore, could generate photosensitivity reactions, there is little research on the associated mechanism. In this context, our group has investigated the molecular basis, both chemical and biological, of two TKIs, namely imatinib and lapatinib. These studies show how understanding drug's photoreactivity in a biological environment is crucial for understanding the mechanisms by which photoinduced damage occurs. Furthermore, a direct correlation was established between the photobehaviour of LAP and its main metabolites with the photobiological damage they generate. Various spectroscopic techniques were used, such as fluorescence and transient absorption, which are highly sensitive and can detect transient species that could be responsible for photosensitization.

With this background and having recently studied the photo(geno)toxicity that the TKI gefitinib (GFT) and its main photoactive metabolites (GFT-M1

and GFT-M2) can induce, a detailed study on their photoreactivity has been carried out, both in organic solution and within transport proteins. Additionally, the binding mode of GFT, GFT-M1 and GFT-M2 to proteins and the main interactions that take place in the supramolecular complex after excitation with UV-A light have also been studied, with the aim of establishing a good correlation between their photophysical properties and their phototoxic potential.

First, the photobehavior of GFT, GFT-M1, and GFT-M2 was studied in organic solution using solvents of different polarities. In this way, the main transient species formed and the photoinduced processes that occur upon UV-A light excitation were detected and characterized. In general, both for the drug and its metabolites, a strong dependence on the solvent polarity was observed. Thus, in nonpolar solvents, mainly localized singlet excited states (LE) are formed, which are the direct precursors of triplet excited states. However, in more polar media, LE states are initially formed, which rapidly evolve towards the formation of intramolecular charge transfer (ICT) states. In this environment triplet excited states are mainly formed from ICT states. Triplet excited states were fully characterized through various photophysical experiments such as quenching by molecular oxygen and photosensitization with appropriate donors or acceptors.

After that, the photophysical behaviour of the drug and its metabolites in a biological medium was investigated using two of the most important and abundant transport proteins in the bloodstream – human serum albumin and human  $\alpha_1$ -acid glycoprotein (HSA and HAG, respectively). In general, a significant increase in drug or metabolites emission bound to

proteins was observed, compared to their emission in bulk aqueous solution. This increase is due to the constraint environment within the protein cavity that hinders conformational relaxation. Regarding interactions inside the protein, significant differences were observed. Thus, for GFT@protein, only the formation of LE excited states was observed; from these, an electron transfer process can take place from the tryptophan or tyrosine residues to  $LE^{-1}GFT^*$ . However, in the case of GFT-M1@HSA, a photoinduced proton transfer process was revealed to form phenolate-like species in the excited state. By contrast, this process is much less important in the GFT-M1@HAG complexes, where emission from LE states was predominantly observed. On the contrary, the excitation of GFT-M2@HSA mainly generates LE states, while for GFT-M2@HAG, phenolate-like species are formed to a greater extent. It is noteworthy that the formation of triplet excited states was not detected inside the protein in any case, which might have biological implications since the mechanism of drug or metabolites for their phototoxic potential ought to follow a type I mechanism.

Additional studies using fluorescence spectroscopy and molecular modelling allowed the investigation of the preferred binding site for the drug or its metabolites to transport proteins, as well as the adopted conformation and main interactions taking place inside the protein cavity. For HSA, it was observed that the preferred binding site of GFT, GFT-M1, and GFT-M2 is site 3. Additionally, the binding constants ( $K_B$ ) of the three ligands to both proteins were calculated, obtaining similar values for all of them. Regarding interactions with amino acids in HSA, different behaviours were observed for GFT, GFT-M1, and GFT-M2. Since GFT-M1 is a phenol, it forms a hydrogen bond with valine 116, enabling

photoinduced proton transfer processes and, therefore, generating phenolate-like species. In contrast, GFT-M2 undergoes a 180° turn for binding, thus although being also a phenol, it avoids the formation of phenolate-like species and favours the formation of LE states. However, the opposite occurs in HAG, since GFT-M2 is oriented so that the phenol interacts through a hydrogen bond with histidine 97, allowing photoinduced proton transfer and, therefore, the generation of phenolate-like species.

Hence, the photophysical behaviour of GFT and its phenolic metabolites has been studied and understood, both in organic solution and within HSA and HAG transport proteins. Additionally, the transient species generated after excitation have been fully characterized, and the main processes that occur after the interaction of GFT, GFT-M1, and GFT-M2 with UV-A light have been described in detail. Thus, a good correlation between the observed photobehaviour and the phototoxic potential of the three studied compounds has been established.

# ÍNDICE

## Capítulo 1. Introducción

1.1. El cáncer y sus tratamientos .....	3
1.1.1. Evolución en los tratamientos contra el cáncer .....	4
1.1.2. Fármacos anticancerígenos .....	6
1.1.2.1. Fármacos inhibidores de la tirosina quinasa .....	6
1.2. Fotosensibilización de fármacos fotoactivos .....	11
1.2.1. Fototoxicidad de inhibidores de la tirosina quinasa .....	15
1.2.1.1. Mecanismos de fototoxicidad .....	17
1.3. Fundamentos fotofísicos y fotoquímicos .....	18
1.3.1. Procesos e interacciones fotofísicas .....	19
1.4. Interacciones fármaco@proteína .....	25
1.5. Comportamiento fotoquímico del TKI lapatinib .....	27
1.6. Referencias .....	30

<b>Capítulo 2. Objetivos .....</b>	<b>39</b>
------------------------------------	-----------

## Capítulo 3. Caracterización de los estados excitados de gefitinib y sus principales metabolitos fotoactivos en disolución orgánica

3.1. Introducción .....	45
3.2. Resultados y discusión .....	48
3.2.1. Estudio fotofísico de GFT .....	48
3.2.2. Estudio fotofísico de GFT-M1 y GFT-M2 .....	61
3.3. Conclusiones .....	67
3.4. Procedimiento experimental .....	70
3.4.1. Materiales .....	70
3.4.2. Medidas espectroscópicas .....	70
3.4.3. Experimentos de desactivación del triplete por oxígeno .....	71

3.4.4. Experimentos de LFP en presencia e NPX y MAP .....	72
3.4.5. Medidas de oxígeno singlete .....	72
3.5. Referencias .....	73

## **Capítulo 4. Comportamiento fotofísico de gefitinib y de sus metabolitos fenólicos en medio biológico**

4.1. Introducción .....	79
4.2. Resultados y discusión .....	81
4.2.1. Caracterización fotofísica de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en HSA .....	81
4.2.2. Caracterización fotofísica de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en HAG .....	102
4.3. Conclusiones .....	107
4.4. Procedimiento experimental .....	110
4.4.1. Materiales .....	110
4.4.2. Análisis <i>Job plot</i> .....	110
4.4.3. Medidas espectroscópicas .....	112
4.5. Referencias .....	114

## **Capítulo 5. Interacción de gefitinib y de sus metabolitos fenólicos con proteínas transportadoras**

5.1. Introducción .....	121
5.2. Resultados y discusión .....	123
5.2.1. Estudio de las interacciones de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en HSA .....	123
5.2.2. Estudio de las interacciones de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en HAG .....	133
5.3. Conclusiones .....	138
5.4. Procedimiento experimental .....	140
5.4.1. Materiales .....	140



5.4.2. Experimentos de desplazamiento con sondas de unión selectivas .....	140
5.4.3. Simulación y cálculos de acoplamiento molecular .....	141
5.4.4. Cálculo de las constantes de unión .....	141
5.4.5. Medidas espectroscópicas .....	145
5.5. Referencias .....	147
<b>Capítulo 6. Conclusiones .....</b>	<b>157</b>
 <b>Anexo I. Difusión de los resultados y otras publicaciones</b>	
Artículos publicados .....	165
Otros artículos .....	166
Participación en congresos .....	167
 <b>Anexo II. Técnicas espectroscópicas y metodología</b>	
II.I. Espectroscopía de absorción UV-Vis .....	217
II.II. Espectroscopía de fluorescencia .....	218
II.III. Espectroscopía de fosforescencia .....	220
II.IV. Espectroscopía de absorción transitoria .....	221





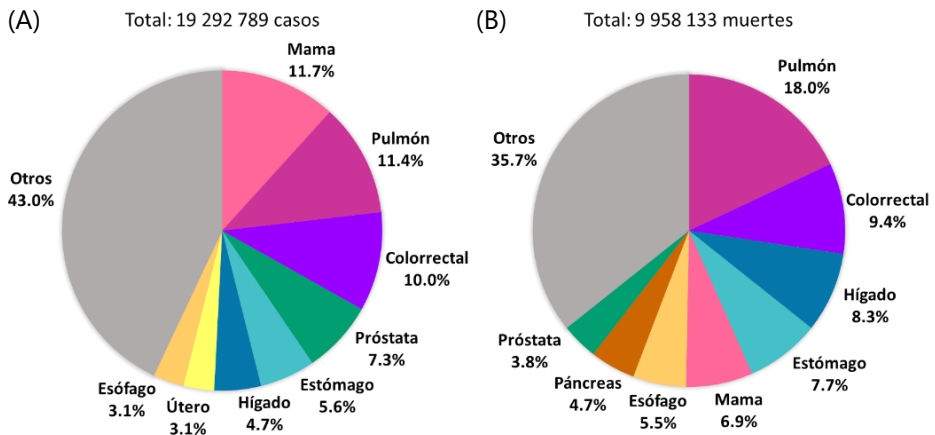
# Capítulo 1. Introducción





## 1.1. EL CÁNCER Y SUS TRATAMIENTOS

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracteriza por el crecimiento descontrolado de células anormales, con la consiguiente aparición de una masa localizada llamada tumor, a excepción del cáncer de sangre. Actualmente, es una de las principales causas de muerte, seguida de las enfermedades cardiovasculares, que afecta a cerca de 20 millones de personas en todo el mundo con una tasa de mortalidad superior al 50 %, según los datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el año 2020 (figura 1.1). La probabilidad de que una persona desarrolle algún tipo de cáncer a lo largo de su vida es del 41 % en hombres y del 38 % en mujeres, y a pesar de que hoy en día existen tratamientos para combatir esta enfermedad, todos ellos presentan ciertas limitaciones en cuanto a efectividad, selectividad o efectos adversos, por lo que se trata de un campo abierto para la investigación científica.<sup>1</sup>



**Figura 1.1.** (A) Número de casos de cáncer y (B) número total de fallecidos por cáncer clasificados por tipología de la enfermedad en personas de todas las edades y sexos reportados por la OMS para el año 2020. Figura adaptada de la referencia 1.

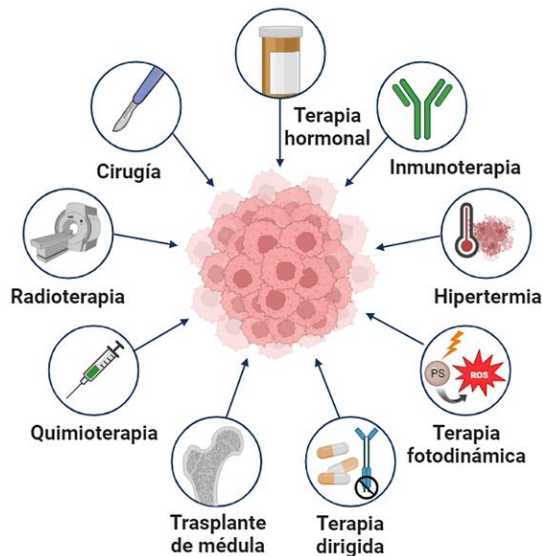
### 1.1.1. Evolución en los tratamientos contra el cáncer

En épocas antiguas como el antiguo Egipto y la antigua Grecia, la única opción que se contemplaba como tratamiento contra el cáncer era la extirpación de las zonas afectadas mediante cirugía. Sin embargo, en muchas ocasiones, este tratamiento resultaba insuficiente y demasiado agresivo, llegando a provocar infecciones graves e incluso la muerte del paciente. A lo largo de los siglos posteriores, gracias a los grandes avances tecnológicos y junto a los nuevos descubrimientos en cuanto a las características patológicas y biológicas de los tumores, se lograron mejorar en gran medida los tratamientos terapéuticos contra el cáncer. En este sentido, el descubrimiento de los rayos X a finales del siglo XIX supuso una revolución para la medicina oncológica, puesto que permitió el desarrollo de la radioterapia, tratamiento que no requería emplear ningún tipo de cirugía. Posteriormente, durante la Segunda Guerra Mundial, se desarrollaron nuevos fármacos anticancerígenos, tratamiento conocido como quimioterapia, que atacaban a las células cancerosas; sin embargo, también inducían la muerte de otras células sanas del cuerpo, provocando gran cantidad de efectos secundarios.<sup>2,3</sup>

En los inicios de los años 80 se produjo un punto de inflexión en el campo terapéutico oncológico. Así, nuevos hallazgos dentro de las ramas de la inmunología, biología celular y biología molecular, llevados a cabo por los investigadores Stanley Cohen y Michael Waterfield, permitieron comprender las bases de los procesos biológicos involucrados en el desarrollo del cáncer. En sus estudios, Cohen y Waterfield identificaron y aislaron tanto el factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*, EGF) como su receptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR). En este sentido, observaron en varios tipos de tumores que el EGFR se reproducía de forma descontrolada tras sufrir mutaciones, translocaciones

o amplificaciones, lo que llevaba a la desregulación de las distintas cascadas de señalización activadas en los dominios de las proteínas tirosina quinasa y, por tanto, al desarrollo y crecimiento de tumores.<sup>4,5</sup> Dichos estudios supusieron un gran avance en el tratamiento del cáncer puesto que, gracias a ellos, se propuso el bloqueo del factor EGFR y por tanto de la actividad de la tirosina quinasa como estrategia para evitar la proliferación tumoral y, de esta manera, se estableció el punto de partida para el desarrollo de la primera terapia dirigida.

En la actualidad, hay diversas opciones para tratar el cáncer (ver figura 1.2), siendo lo más habitual combinar uno o varios de los tratamientos disponibles en función del tipo de cáncer y el estado en el que se detecta. Existen técnicas como la inmunoterapia y la terapia dirigida, las cuales están aún en desarrollo, que buscan mejorar la selectividad y reducir los efectos secundarios que puedan generarse por el uso de tratamientos tradicionales como son la radioterapia y quimioterapia.<sup>6</sup>



**Figura 1.2.** Tratamientos contra el cáncer utilizados en la actualidad. Creada con BioRender.com

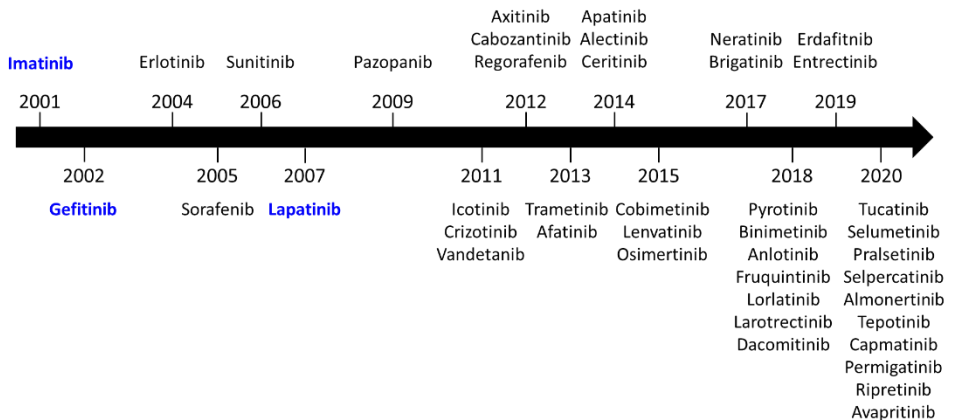
### 1.1.2. Fármacos anticancerígenos

Actualmente se dispone de un gran abanico de fármacos utilizados para el tratamiento de distintos tipos de cánceres. Entre ellos se encuentran los fármacos empleados en la quimioterapia clásica, tales como los alquilantes, como es el caso de la ciclofosfamida, o los derivados del platino, como es el cisplatino. Éstos actúan sobre el ADN impidiendo la replicación y la transcripción de ARN y, por tanto, la proliferación celular y la síntesis de proteínas.<sup>6</sup> También existen fármacos que actúan sobre otros factores distintos para frenar la proliferación celular, como son los empleados en terapia hormonal, cuya actividad farmacológica es la de reducir los niveles de hormonas estimulantes inhibiendo sus receptores, o los empleados en terapia inmunológica, como son los anticuerpos monoclonales específicos de los antígenos que se encuentran en las células cancerosas. Sin embargo, todos estos fármacos presentan como principal inconveniente una toxicidad elevada que afecta tanto a células cancerosas como a sanas, produciendo graves problemas de salud para el paciente.<sup>7</sup> En este sentido, estos problemas se pueden reducir significativamente mediante el uso de fármacos que actúen directamente sobre moléculas diana específicas de las células tumorales, como es el caso de los inhibidores de la tirosina quinasa (*tyrosine kinase inhibitors*, TKIs). Tal y como se ha explicado en el punto anterior, el descubrimiento de EGF y EGFR fue el punto de inicio para el desarrollo de este tipo de fármacos. Su principal ventaja radica en la elevada selectividad, que permite mejorar la efectividad y reducir en gran medida los efectos adversos, consiguiendo mejorar hasta en un 50 % la supervivencia del paciente.<sup>4,5</sup>



### 1.1.2.1. Fármacos inhibidores de la tirosina quinasa

A partir de los años 90 comenzaron a diseñarse fármacos TKIs para tratar diferentes tipos de cánceres tales como el cáncer de mama metastásico (trastuzumab), la leucemia mielógena crónica (imatinib), o el cáncer de pulmón no microcítico avanzado (gefitinib), entre otros.<sup>8</sup> La principal ventaja de estos nuevos fármacos frente a otros radica, como se ha mencionado anteriormente, en su elevada selectividad. Así pues, en lugar de atacar a todas las células indiscriminadamente, tal y como ocurre también con otros tratamientos como la radioterapia o la quimioterapia clásicas, estos fármacos se han diseñado con la finalidad de atacar preferentemente a las células oncogénicas alteradas que se relacionan con la promoción tumoral.<sup>5,9-11</sup>



**Figura 1.3.** Línea temporal de la aprobación de fármacos TKIs para ser empleados en terapia contra distintos tipos de cáncer. Figura adaptada de la referencia 8.

En 1992 se llevaron a cabo ensayos clínicos con el inhibidor del EGFR trastuzumab, en los cuales se obtuvieron por primera vez resultados positivos en relación a la inhibición del crecimiento tumoral en pacientes con cáncer de mama.<sup>4</sup> No obstante, no fue hasta 1998 cuando la Administración de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drug Administration*, FDA) de los Estados Unidos aprobó el uso de trastuzumab en terapia contra el cáncer de mama metastásico.<sup>3</sup> Con el cambio de siglo,

y gracias a la ingeniería genética, se empezaron a diseñar nuevos TKIs para el tratamiento de tumores avanzados e incluso para algunos cánceres para los que no existía aún ningún tratamiento efectivo (figura 1.3).<sup>4,8</sup>

Como se ha comentado con anterioridad, el mecanismo de acción de estos fármacos se basa en la inhibición de la actividad de la proteína tirosina quinasa mediante la unión a distintos receptores, bloqueando así su activación (figura 1.4). Concretamente, estos receptores se activan por dimerización en presencia de distintos ligandos de unión, la cual puede darse entre dos receptores del mismo tipo (homodimerización) o entre dos receptores de distinto tipo (heterodimerización). Por tanto, las posibilidades de unión entre los distintos receptores EGFR son múltiples, y cada complejo formado se encarga de regular distintas cascadas de señalización intracelular. Tras la dimerización de estos receptores, se produce la fosforilación del adenosín difosfato (ADP) a adenosín trifosfato (ATP) en los dominios de la tirosina mediante la actividad de la proteína tirosina quinasa, provocando distintas respuestas celulares específicas como son la proliferación, supervivencia o diferenciación celular.<sup>8,12</sup>

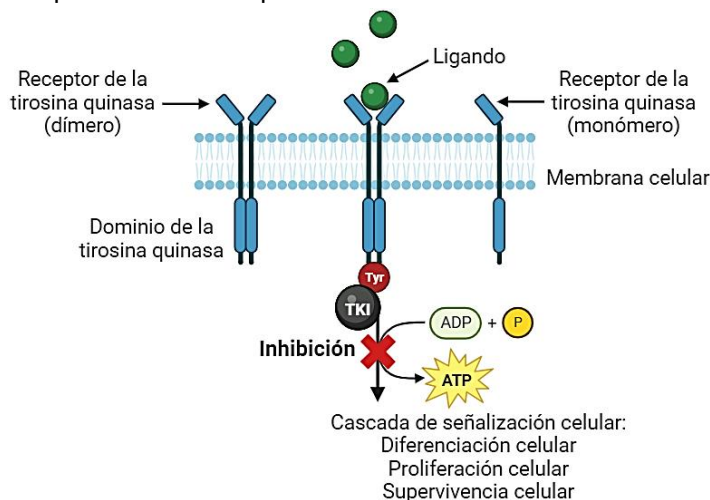


Figura 1.4. Representación esquemática del mecanismo de acción genérico de los TKIs.

Creado con BioRender.com.

Los TKIs se pueden clasificar por categorías en función del tipo de unión que realizan:

- Tipo I: se caracterizan por formar uniones no covalentes y, por tanto, reversibles, en el sitio de unión activo del ATP.
- Tipo II: se unen al sitio adyacente del ATP para mantener la conformación inactiva.
- Tipo III: son altamente selectivos y se unen a sitios de unión alejados del ATP, por lo que también se conocen como inhibidores alostéricos.
- Tipo IV: al igual que los del tipo III, se unen a sitios de unión alejados del ATP, pero en este caso, forman uniones reversibles.
- Tipo V: son inhibidores que forman enlaces covalentes, y por tanto irreversibles, en los sitios de unión.

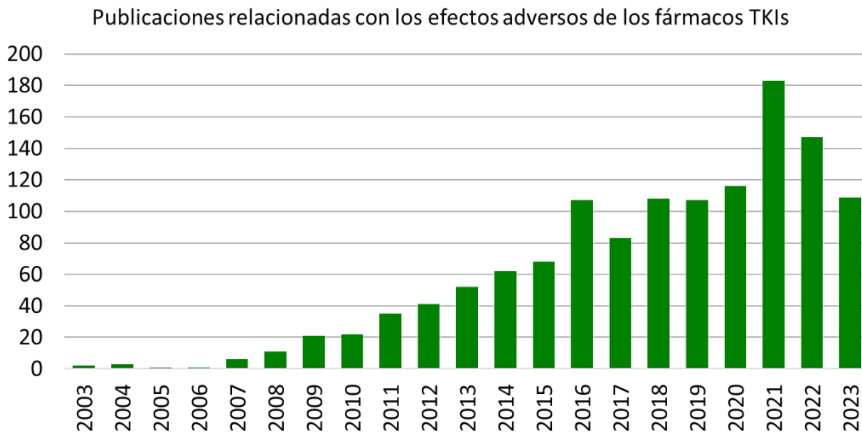
De entre todos los tipos que se definen, la mayoría de TKIs son inhibidores de tipo I y, en menor medida, de tipo II.<sup>8,11,13</sup>

Desde la aprobación por la FDA en 2001 del uso de imatinib para el tratamiento de la leucemia mielógena crónica, se han desarrollado gran cantidad de TKIs con buenos resultados terapéuticos.<sup>8</sup> Dado que el receptor EGFR fue el primer receptor de la tirosina quinasa en estudiarse de manera aislada y relacionarse con la proliferación tumoral, los fármacos inhibidores de este receptor fueron de los primeros en ser desarrollados. Principalmente, estos fármacos van dirigidos a bloquear uno o varios de los receptores homólogos que constituyen la familia de receptores EGFR (HER1, HER2, HER3, HER4), los cuales están implicados en el desarrollo del cáncer de mama y de pulmón,<sup>8,14</sup> entre otros, que se posicionan a nivel mundial como el primer y segundo tipo de cánceres con mayor incidencia (figura 1.1).<sup>1</sup>

La primera generación de fármacos inhibidores del EGFR comenzó a diseñarse en torno a los años 2000. Algunos ejemplos de esta generación de TKIs son gefitinib y erlotinib, inhibidores de tipo I aprobados por la FDA para el tratamiento de cáncer de pulmón en fase metástasis y, en el caso de erlotinib, también para el tratamiento del cáncer de páncreas metastásico.<sup>11</sup> Posteriormente surgieron los TKIs de segunda generación, los cuales se unen de forma irreversible al dominio de la tirosina quinasa, como es el caso de afatinib, aprobado en 2013 para su uso en terapia del cáncer de pulmón no microcítico (*non-small cell lung cancer*, NSCLC) avanzado local o en fase de metástasis.<sup>11</sup> Desafortunadamente, tanto los TKIs de primera generación como los de segunda generación sufren una disminución de su efectividad al ser suministrados a pacientes durante largos periodos de tiempo por la aparición de mutaciones en EGFR. Con el fin de superar este obstáculo, se diseñaron los TKIs de tercera generación, los cuales inhiben principalmente los receptores con mutaciones. Un ejemplo de ello es osimertinib, aprobado en el 2015 para tratar NSCLC con la mutación en EGFR T790M.<sup>11,14</sup>

Los TKIs se pueden utilizar de forma individual, así como en combinación con otros TKIs u otro tipo de terapias. No obstante, a pesar del beneficio que ha supuesto para los pacientes oncológicos el uso de estos fármacos, también se han descrito efectos adversos como toxicidad gastrointestinal, irritación o ulceración de la piel, e incluso en algunos casos reacciones de fotosensibilización, como la fotodermatitis.<sup>11,15,16</sup> En este sentido, existe un notable aumento en el número de publicaciones relacionadas con los efectos adversos de estos inhibidores, tal y como se puede observar en la figura 1.5, reflejando la creciente preocupación de la comunidad científica en relación a este tema. Por ello, con el fin de priorizar y maximizar la seguridad del paciente tratado con estos fármacos, es conveniente

estudiar y tener en cuenta los problemas secundarios que pueden derivar.<sup>15,17</sup>



**Figura 1.5.** Número de publicaciones en los últimos 20 años relacionadas con los efectos adversos provocados por el uso de TKIs. Fuente: SciFinder (consultado el 04/09/2023).

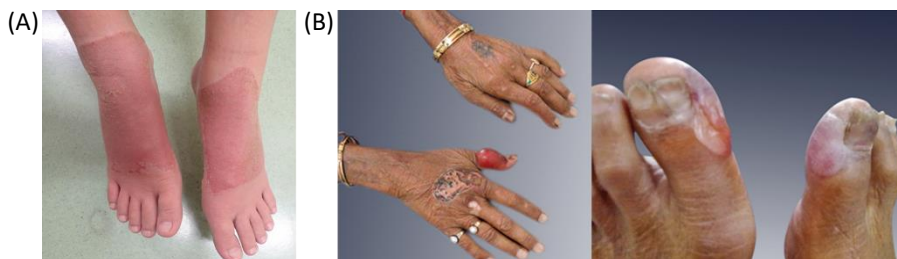
## 1.2. FOTOSENSIBILIZACIÓN DE FÁRMACOS FOTOACTIVOS

Las reacciones de fotosensibilización son un tipo de reacciones adversas que pueden inducir los fármacos fotoactivos, que son aquellos capaces de interactuar con luz de una determinada energía. Para que un fármaco pueda actuar como fotosensibilizador, necesariamente debe contener un cromóforo en su estructura para absorber parte de la luz solar que llega a la superficie terrestre. En este sentido, la radiación solar se divide en radiación ultravioleta C (UV-C, de 200 a 290 nm), radiación ultravioleta B (UV-B, de 290 a 315 nm), radiación ultravioleta A (UV-A, de 315 a 400 nm), radiación visible (de 400 a 700 nm) y radiación infrarroja (superior a 700 nm). Entre ellas, la radiación UV se considera la más dañina a nivel biológico, siendo la UV-A la que llega mayoritariamente a la superficie terrestre y, por tanto, aun siendo la menos energética, es la que principalmente se relaciona con procesos de fotosensibilización.<sup>18</sup>

Los procesos de fotosensibilización generalmente se manifiestan en forma de lesiones cutáneas superficiales (quemaduras, eccemas, urticaria), fotodermatosis, hipo- o hiperpigmentación, o incluso desarrollando enfermedades como la pseudoporfiria o, en los peores casos, cáncer de piel.<sup>19,20</sup> Sin embargo, a pesar de que cada vez son más las reacciones adversas cutáneas que se relacionan con estos procesos, existen pocos trabajos de investigación que estudien en detalle el origen o la naturaleza de estas, pues se consideran reacciones de peligrosidad baja o media y que se pueden controlar interrumpiendo el tratamiento con el fármaco que las produce. Por ello se trata de un campo de estudio abierto que poco a poco ha ido cobrando más importancia, centrándose en entender los mecanismos y las respuestas celulares que se desencadenan por la interacción entre fármacos fotosensibilizadores y luz solar, con el fin de identificar y prevenir posibles reacciones adversas.<sup>20,21</sup>

En detalle, el proceso de fotosensibilización comienza tras la absorción de luz por parte de un fotosensibilizador (FS). Una vez que el fármaco se encuentra en su estado excitado se pueden generar distintas especies (singlete, triplete, radicales, etc.), que podrían inducir daño a biomoléculas, tales como proteínas, ADN o lípidos, mediante procesos de transferencia de energía, transferencia electrónica o transferencia de protón.<sup>22</sup> Además, el FS también puede reaccionar desde cualquiera de sus estados excitados dando lugar a un compuesto químico diferente, generando un fotoproducto que puede ser fotosensibilizante aunque el fármaco inicialmente no lo sea. Cualquiera de estos procesos puede inducir daño biológico fotoinducido, y como consecuencia de ello producir lesiones en el organismo. Existen dos tipos de daño fotosensibilizado, los cuales se describen a continuación:<sup>18,23</sup>

- **Fotoalergia:** son reacciones de hipersensibilidad producidas como respuesta del sistema inmunitario. En ellas, tras la absorción de luz por parte del fármaco, se produce la unión a proteínas de membrana, actuando como hapteno el propio fármaco o sus fotoproductos, para dar lugar a la formación de un alérgeno. En este caso, el daño generado no es inmediato ni depende de la cantidad de fotosensibilizador que haya presente. Normalmente, estas reacciones suelen producirse más con sustancias que se aplican sobre la piel, y en general se manifiestan con la aparición de erupciones, enrojecimientos y edema. En este caso el daño puede extenderse a zonas que no han estado expuestas a la radiación.
- **Fototoxicidad:** se produce cuando un fármaco fotosensibilizador absorbe luz e interacciona desde su estado excitado con biomoléculas o con oxígeno molecular, pudiendo desencadenar una serie de reacciones que generan daño a las principales dianas moleculares (lípidos, proteínas, ADN). La gravedad de las lesiones producidas depende directamente de la cantidad de FS expuesto a la luz solar. Este tipo de daño fotosensibilizado que generalmente está provocado por sustancias sistémicas es el más común, aunque la dosis de irradiación necesaria es superior que en la fotoalergia. En este caso, las lesiones aparecen de forma inmediata tras la exposición a la luz solar y suele manifestarse en forma de quemaduras.<sup>21,23</sup>



**Figura 1.6.** Reacciones adversas fotosensibilizadas por (A) ketoprofeno, dando lugar a eritemas y pequeñas ampollas en la zona tratada y (B) imatinib, produciendo ampollas graves y erosiones cutáneas en manos y pies.<sup>24,25</sup>

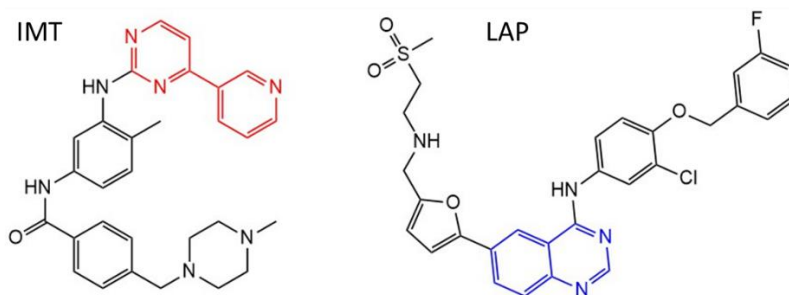
Existen numerosos ejemplos de fármacos capaces de interactuar con luz, pudiendo inducir reacciones de fotosensibilización como las mostradas en la figura 1.6. Entre ellos se encuentran los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (*non-steroidal antiinflammatory drugs*, NSAIDs), como es el caso de los derivados de los ácidos 2-arilpropiónicos, como ibuprofeno y ketoprofeno.<sup>18,21,22</sup> También son un ejemplo de ello los fármacos anticancerígenos que contienen el cromóforo quinazolina en su estructura, como es el caso de lapatinib (LAP).<sup>26,27</sup> Sin embargo, en algunas ocasiones no es tan sencillo identificar las especies responsables de los procesos fotofísicos que pueden dar lugar a este tipo de reacciones adversas, por lo que se requiere de un estudio exhaustivo para llegar a entenderlo, como en el caso de imatinib (IMT), en el que fue necesario dividir la molécula para identificar la subestructura responsable del daño fotoinducido a biomoléculas.<sup>28</sup>

Dado que las reacciones de fototoxicidad son más comunes que las de fotoalergia, en el siguiente apartado se profundizará en ellas.<sup>21</sup> En concreto, se va a detallar la fotorreactividad de los dos últimos fármacos mencionados anteriormente: imatinib y lapatinib.



### 1.2.1. Fototoxicidad de TKIs

En ocasiones, los TKIs inducen reacciones adversas de tipo cutáneo que pueden estar relacionados con un carácter fototóxico.<sup>19,20</sup> Sin embargo, existen muy pocos estudios en los que se haya investigado a nivel molecular los mecanismos implicados para inducir dichas reacciones, por lo que se desconoce realmente el origen de las mismas.<sup>21,23</sup> En este contexto, sí que existen algunos estudios previos para los fármacos IMT y LAP, cuyas estructuras se muestran en la figura 1.7.<sup>28,29</sup>



**Figura 1.7.** Estructuras moleculares de imatinib y lapatinib con los respectivos cromóforos resaltados en color rojo y azul, respectivamente.

Así, imatinib es un TKI que fue bautizado como “bala mágica” por su capacidad para reducir la mortalidad de diversos tipos de cáncer hasta llevarlos a condiciones crónicas manejables.<sup>28</sup> Sorprendentemente, a pesar de que se han publicado efectos adversos de fotosensibilización y pseudoporfiria, ensayos *in vitro* muestran que este fármaco no presenta carácter fototóxico. No obstante, un estudio realizado sobre las distintas fragmentaciones moleculares de IMT ha demostrado que desde el estado excitado triplete de la subestructura piridil-pirimidina (resaltado en rojo en la figura 1.7) se puede inducir daño al ADN.<sup>28</sup> Además, explican que la incongruencia entre la fotogenotoxicidad inducida por esta subestructura

y la observada al estudiar el fármaco, que es prácticamente nula, puede deberse a un proceso de desactivación intramolecular de dicho estado excitado triplete. Estos resultados permiten relacionar el origen de las reacciones cutáneas fotoinducidas por el fármaco con otros procesos indirectos, por lo que demuestran la importancia de llevar a cabo estudios moleculares exhaustivos para poder entender en detalle los mecanismos por los que se inducen las reacciones de fototoxicidad.<sup>28</sup>

Por otro lado, lapatinib suele utilizarse en combinación con otros agentes quimioterapéuticos en terapia contra el cáncer de mama.<sup>26</sup> Asimismo, también se utiliza como fármaco de administración oral para tratar tumores sólidos en pacientes con cáncer de mama y/o de pulmón. Sin embargo, a pesar de sus múltiples beneficios, también se deben tener en cuenta sus efectos adversos. En este sentido, LAP contiene en su estructura el cromóforo quinazolina (resaltado en azul en la figura 1.7), del cual se conoce que puede absorber luz solar y generar daño fotoinducido, principalmente de tipo fototóxico.<sup>27</sup> Estudios previos mostraron la relación existente entre las propiedades fotofísicas de LAP con el daño fotobiológico que puede producir tras interactuar con luz UV-A. Así, se han identificado las especies transitorias que se generan tras irradiar LAP a 330 nm, caracterizándose los rendimientos cuánticos y los tiempos de vida media de dichas especies en su estado excitado, las cuales serán las responsables de generar daño fotoinducido. Por tanto, el mecanismo propuesto para provocar dicho daño implica procesos de transferencia electrónica desde el estado excitado singlete de LAP.<sup>26,27,29</sup>

En resumen, la investigación de las propiedades fotofísicas de fármacos mediante el uso de técnicas espectroscópicas permite obtener

información relevante sobre las especies transitorias generadas que serán las responsables de las reacciones adversas. Así pues, un estudio completo sobre la fotorreactividad de un fármaco en diferentes medios ayuda a conocer con mayor detalle el mecanismo por el cual se pueden producir los procesos de fotosensibilización, lo que puede suponer un gran avance en la mejora de los diagnósticos y pautas preventivas en pacientes que estén bajo tratamiento con fármacos fotosensibilizadores.

### 1.2.1.2. Mecanismos de fototoxicidad

Las reacciones de fototoxicidad se producen como consecuencia del daño fotoinducido a biomoléculas debido a que pueden producirse roturas de cadena simple o doble del ADN, fotooxidación de proteínas o a la membrana lipídica, entre otras.<sup>22,23</sup> Las especies responsables de este daño pueden ser bien radicales generados tras un proceso de transferencia electrónica o de abstracción de hidrógeno entre el fármaco en su estado excitado y la biomolécula, o bien especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS), como el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), que se forma tras un proceso de transferencia de energía triplete-triplete (*triplet-triplet energy transfer*, TTET) entre el fármaco en su estado excitado y el oxígeno molecular, así como de peróxidos o radicales hidroxilo (figura 1.8). Así pues, la fototoxicidad se clasifica en función de las especies responsables de generarla, siguiendo un mecanismo de tipo I cuando el daño lo generan especies radicalarias, o de tipo II cuando el daño es inducido por ROS.<sup>22</sup>

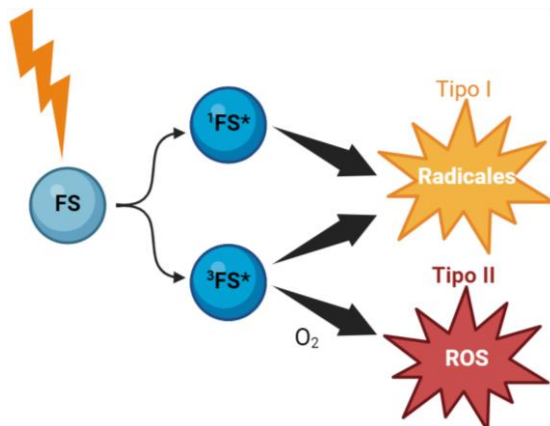


Figura 1.8. Representación esquemática de los mecanismos tipo I y tipo II del daño fotobiológico que puede generar un fotosensibilizador (FS) tras absorber luz.

La fototoxicidad que pueda generar un fármaco está íntimamente relacionada con las propiedades fotofísicas y los procesos fotoinducidos que se pueden generar tras su interacción con la luz, los cuales son altamente dependientes del microambiente en el que se encuentre el fármaco.<sup>19–23</sup>

### 1.3. FUNDAMENTOS FOTOFÍSICOS Y FOTOQUÍMICOS

La fotoquímica es la ciencia que estudia la interacción entre la materia y la luz, así como los cambios que pueden ocurrir a consecuencia de dichas interacciones. En el caso de moléculas orgánicas, los procesos químicos y físicos se originan generalmente tras la absorción de luz de una determinada energía por parte de un cromóforo. En ese momento, un electrón del orbital molecular ocupado de mayor energía (*highest occupied molecular orbital*, HOMO) puede subir al orbital desocupado de menor energía (*lowest unoccupied molecular orbital*, LUMO) manteniendo su multiplicidad de espín, de manera que la molécula pasa de su estado fundamental  $S_0$  a un estado excitado singlete  $S_n$  de energía superior. Desde este nivel, el cual dependerá de la energía absorbida y,

por tanto, de la longitud de onda con la que es irradiada la molécula, se disipará el exceso de energía de los electrones y se relajarán rápidamente al estado excitado singlete de menor energía  $S_1$  (regla de Kasha),<sup>30</sup> desde donde se podrán iniciar distintos procesos fotofísicos y/o fotoquímicos hasta que la molécula llegue de nuevo a su estado fundamental.<sup>31</sup> En el siguiente apartado se procede a explicar con detalle estos procesos.

### 1.3.1. Procesos e interacciones fotofísicas

Los procesos fotofísicos tienen lugar cuando una molécula en su estado excitado vuelve a su estado fundamental sin realizar cambios en su estructura química. Estos procesos pueden ser de naturaleza radiante o no radiante en función de si emiten la energía absorbida en forma de luminiscencia (fluorescencia o fosforescencia) o no (conversión interna, cruce intersistema o relajación vibracional).<sup>31</sup>

El diagrama de Jablonski (figura 1.9) es una representación esquemática de los distintos niveles de energía y procesos fotofísicos que pueden tener lugar tras la absorción de energía por parte de una molécula que es irradiada. Dichos procesos son competitivos entre sí, siendo más favorables unos que otros, por lo que para cada molécula se darán con mayor o menor rendimiento, lo cual depende de la velocidad a la que ocurra cada proceso. A continuación, se describen los procesos fotofísicos representados en el diagrama de Jablonski:<sup>31,32</sup>

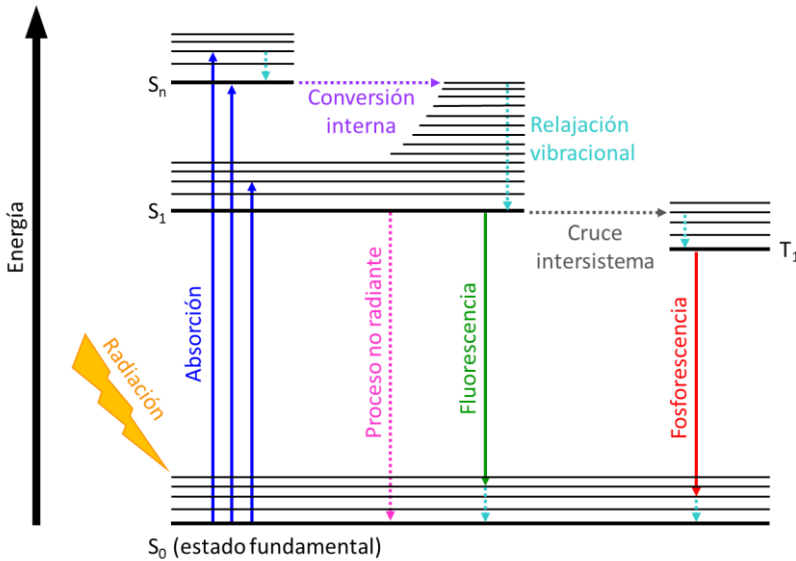


Figura 1.9. Diagrama de Jablonski adaptado de la referencia 31. Los procesos radiantes se muestran en línea continua mientras que los no radiantes se muestran con línea discontinua.

- Fluorescencia (*fluorescence*, F): emisión de energía en forma de luminiscencia que va desde el estado excitado singlete  $S_1$  hasta el estado fundamental  $S_0$ , conservando el espín del electrón. Este proceso suele darse en escalas de tiempo cortas, normalmente del orden de los nanosegundos.
- Fosforescencia (*phosphorescence*, Ph): emisión de energía en forma de luminiscencia que va generalmente desde el primer estado excitado triplete  $T_1$  hasta el estado fundamental  $S_0$ . En este proceso se produce un cambio en el espín del electrón, por lo que se trata de una transición prohibida y, por ello, se da en escalas de tiempo más largas que la fluorescencia, normalmente en escala de microsegundos.

- Conversión interna (*internal conversion*, IC): proceso no radiante por el cual se pasa de un estado electrónico a otro isoenergético manteniendo la misma multiplicidad de espín.
- Cruce intersistema (*intersystem crossing*, ISC): proceso fotofísico no radiante por el cual una molécula cambia de un estado electrónico a otro isoenergético de distinta multiplicidad. Al igual que la fosforescencia, se trata de una transición prohibida, por lo que generalmente es un proceso más lento que aquellos que se dan entre estados electrónicos de la misma multiplicidad de espín.
- Relajación vibracional (*vibrational relaxation*, VR): proceso no radiante por el cual una molécula pasa rápidamente de un estado vibracional de mayor energía al de menor energía o de equilibrio mediante colisiones con el entorno.

De entre todos los procesos descritos anteriormente, los únicos que podemos medir con facilidad son la absorción y la emisión luminiscente, es decir, la fluorescencia y la fosforescencia, pudiendo determinar para un compuesto determinado los espectros de absorción y emisión, intensidades y cinéticas de desactivación en unas condiciones concretas.<sup>31</sup>

Las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de una molécula pueden verse afectadas por el entorno debido a la presencia de otras moléculas que la rodean. Así pues, una de las interacciones más comunes son las asociaciones entre moléculas que, dependiendo de la naturaleza de las interacciones, pueden ser de distintos tipos:<sup>31,32</sup>

- Dímeros: asociación entre dos moléculas iguales que interaccionan en el estado fundamental.

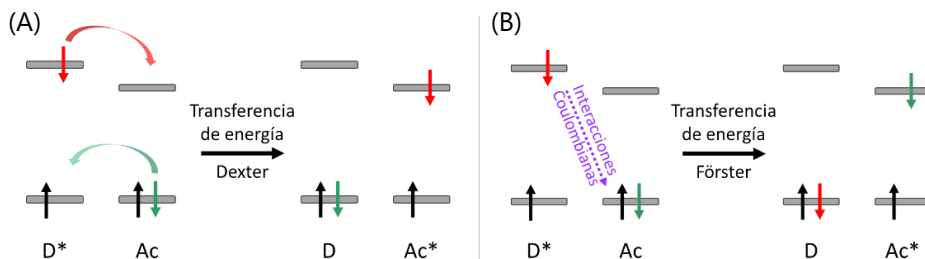
- Complejos: asociación de dos moléculas distintas que interaccionan en el estado fundamental.
- Excímeros: al igual que los dímeros, se trata de una asociación de dos moléculas iguales, pero en este caso no existe interacción entre ellas cuando ambas están en su estado fundamental y sí cuando una de ellas se encuentra en un estado excitado.
- Exciplejos: asociación de dos moléculas distintas que no interaccionan desde su estado fundamental, pero sí lo hacen cuando al menos una de ellas está en un estado excitado.

Además de las asociaciones descritas, también existen otro tipo de interacciones donde los estados excitados de las moléculas pueden desactivarse; entre ellas, las más comunes son los procesos de transferencia de energía, transferencia electrónica y transferencia de protón fotoinducida, así como las reacciones fotoquímicas.<sup>33</sup>

La transferencia de energía es un fenómeno por el cual una molécula que se encuentra en su estado excitado singlete o triplete (dador) genera el mismo estado excitado de otra molécula que se encuentra en su estado fundamental (aceptor). Este proceso puede ser de tipo Dexter o Förster (figura 1.10). En el caso de las transferencias de energía tipo Dexter ocurre un intercambio simultáneo de electrones entre un dador en su estado excitado ( $D^*$ ) y un aceptor en su estado fundamental ( $Ac$ ), por lo que requiere que las moléculas estén lo suficientemente cerca (distancias  $\leq 10$  Å) como para que los orbitales implicados en el proceso se solapen. Por otra parte, las transferencias de energía tipo Förster ocurren mediante interacciones coulombianas, de modo que el dador ( $D^*$ ) pasa su energía al aceptor ( $Ac$ ) y vuelve a su estado fundamental ( $D$ ), llevando al aceptor

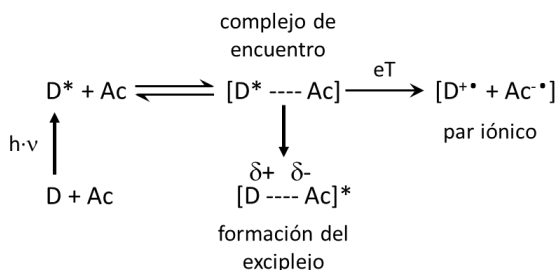


a su estado excitado ( $Ac^*$ ). En este caso, la distancia a la que suelen encontrarse los cromóforos es en torno a 10-100 Å. Para que ocurra este proceso, el espectro de absorción del aceptor debe superponerse con el espectro de emisión del dador.<sup>31,34</sup>



**Figura 1.10.** Representación esquemática de la transferencia de energía tipo Dexter (izquierda) y Förster (derecha). Figura adaptada de la referencia 31.

Por otra parte, el proceso de transferencia electrónica (*electron transfer*, eT) implica la cesión de electrones entre moléculas, dando como resultado la formación de aniones, cationes o especies radicalarias (figura 1.11). Para que este proceso ocurra, una de las dos moléculas implicadas en el proceso, bien el dador o bien el aceptor, debe estar en su estado excitado. En algunos casos, es posible que el complejo de encuentro se estabilice y, en lugar de completarse la transferencia electrónica, se forma un exciplexo (EXC) con un momento dipolar elevado.<sup>31</sup>



**Figura 1.11.** Mecanismo del proceso de transferencia electrónica.

En el caso de la transferencia de protón (*proton transfer*, pT) un dador cede un protón a un aceptor, estando indiferentemente uno de los dos en el estado excitado (figura 1.12).

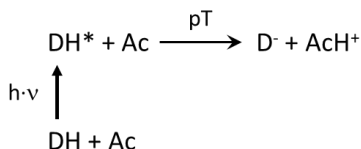


Figura 1.12. Mecanismo del proceso de transferencia de protón.

La termodinámica de estos procesos se puede calcular mediante la ecuación de Rehm-Weller (ecuación 1.1), por lo que el proceso será favorable cuando la variación de la energía libre  $\Delta G$  sea negativa.

$$\Delta G = E_{ox} - E_{red} - E_{0-0} + C \quad (1.1)$$

donde  $E_{ox}$  y  $E_{red}$  son los potenciales de oxidación y de reducción del dador y aceptor en el estado fundamental respectivamente,  $E_{0-0}$  es la energía del estado excitado implicado, y  $C$  es el término culómbico para la estabilización de las especies generadas en el disolvente empleado.<sup>35</sup>

Por último, las reacciones químicas son procesos con mecanismos generalmente complejos, en los que se generan nuevos productos a partir de intermedios de reacción.

Para que estos procesos de desactivación puedan tener lugar, el dador deberá tener necesariamente una energía superior en el estado excitado que la energía del estado excitado del aceptor. Adicionalmente, estos procesos se ven muy afectados por las condiciones en las que se den, dependiendo fuertemente del microambiente en el que se encuentren las especies orgánicas que actúen como dador y aceptor, así como también de la temperatura del medio, el pH, la disposición espacial de las

moléculas, etc. Por ello, es importante estudiar el comportamiento fotofísico de una molécula en diferentes condiciones y así poder caracterizarla correctamente.<sup>31,36</sup>

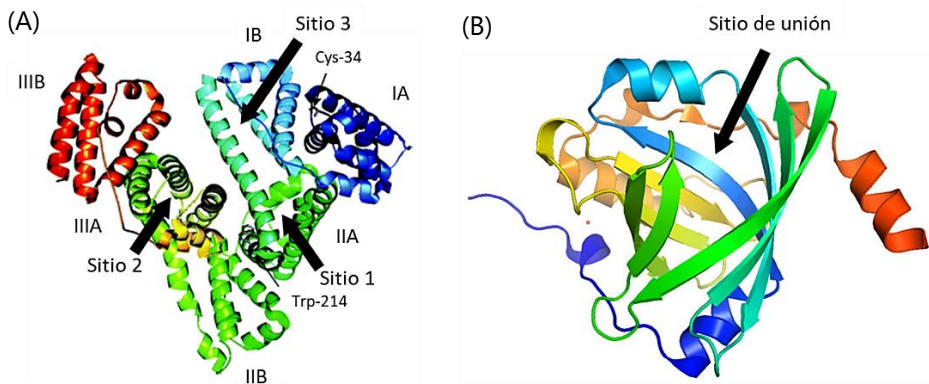
#### 1.4. INTERACCIONES FÁRMACO@PROTEÍNA

Las interacciones entre fármacos y proteínas son de gran importancia ya que controlan procesos importantes en el organismo tales como la solubilidad del fármaco en el plasma sanguíneo, su toxicidad, el transporte y tiempo de vida del fármaco en el organismo, su biotransformación y eliminación, etc.<sup>37,38</sup>

La albúmina sérica humana (*human serum albumin*, HSA), es una proteína muy utilizada para estudiar este tipo de interacciones ya que es una de las más abundantes en el plasma sanguíneo. Esta se encarga principalmente del transporte de sustancias endógenas y exógenas, como fármacos, ácidos grasos, metabolitos o anticuerpos, entre otras moléculas, a través del torrente sanguíneo.<sup>38</sup> Su estructura primaria consta de una cadena simple de 585 aminoácidos entre los cuales se encuentra 1 residuo de triptófano (Trp), 17 puentes disulfuro y una cisteína libre, con un peso molecular aproximado de 67 kDa. Su estructura tridimensional presenta tres dominios I, II y III, cada uno de los cuales se divide en dos subdominios, A y B (figura 1.13A). Existen, según Sudlow, dos sitios de unión preferentes para las moléculas orgánicas pequeñas ubicados en los subdominios IIA y IIIA, denominados sitios 1 y 2, respectivamente. El sitio 1 es de gran tamaño y flexible, y predominan las interacciones tipo hidrofóbicas, mientras que el sitio 2 es más pequeño y menos flexible, y las interacciones que prevalecen son de tipo puente de hidrógeno y electrostáticas.<sup>37,39</sup> Recientemente se ha caracterizado un tercer sitio de

unión (sitio 3) ubicado en el subdominio IB, el cual se ubica muy cerca del sitio 1.<sup>40</sup>

Otra proteína que también suele utilizarse como referencia para investigar las interacciones fármaco@proteína es la  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida de origen humano (*human  $\alpha_1$ -acid glycoprotein*, HAG). Principalmente actúa como proteína transportadora, y su concentración aumenta en el plasma cuando aparecen inflamaciones o infecciones en el organismo. Su estructura consta de 183 aminoácidos y 5 oligosacáridos enlazados a nitrógeno, con un peso molecular aproximado de 44 kDa, que generan hasta siete sitios de unión, aunque la mayoría de las moléculas orgánicas se unen preferentemente sólo a uno de ellos, ya que es el más grande y flexible (Figura 1.13B).<sup>41,42</sup>



**Figura 1.13.** Estructuras cristalinas y sitios de unión de (A) HSA y (B) HAG. Figura adaptada de las referencias 41 y 42.

Desde el punto de vista de los fármacos fotosensibles, su fotorreactividad puede verse alterada al encontrarse dentro de la cavidad de la proteína debido al encapsulamiento y las restricciones conformacionales. El uso de sistemas supramoleculares fármaco@proteína es muy útil para obtener información relevante sobre el comportamiento que puede tener el

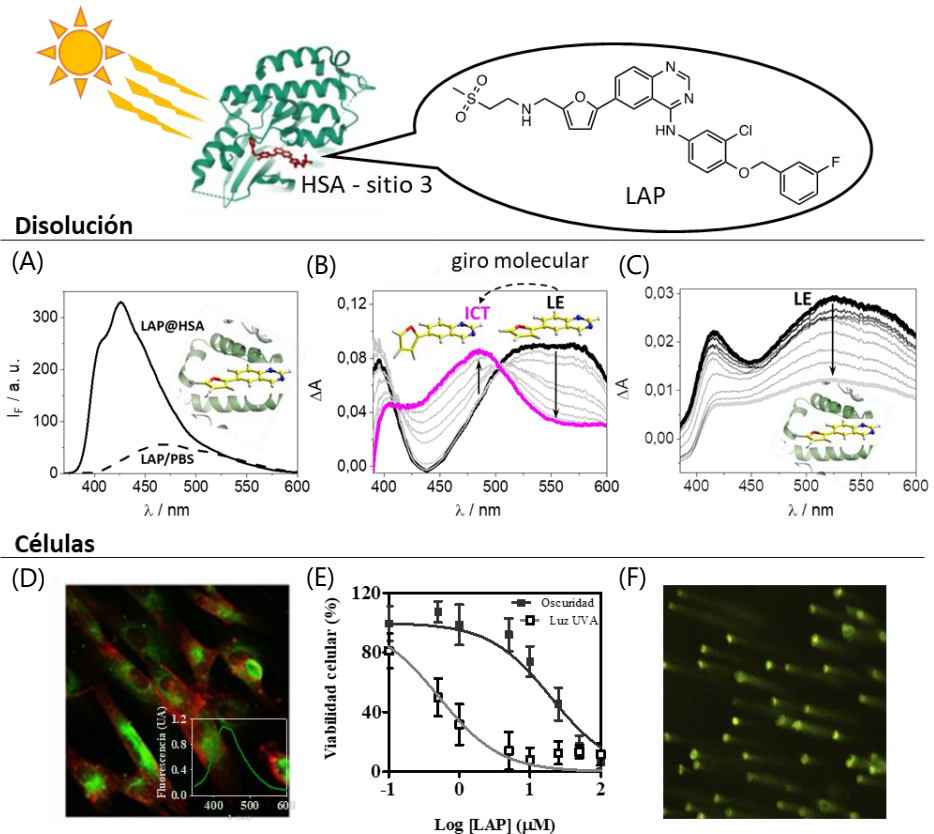
fármaco en el plasma sanguíneo. En relación a esto, existen numerosas técnicas para estudiar las interacciones fármaco@proteína: difracción de rayos X, el aislamiento de fragmentos funcionales, cromatografía líquida de alta resolución, diálisis, ultrafiltración, calorimetría, electroforesis, entre otras.<sup>39,43</sup> Sin embargo, estas técnicas pueden presentar problemas de sensibilidad, selectividad o reproducibilidad. Por otro lado, técnicas espectroscópicas como la fluorescencia y principalmente la absorción transitoria se utilizan actualmente para estudiar las interacciones fármaco@proteína, pues ofrecen una gran sensibilidad y permiten obtener resultados experimentales rápidamente y con un tratamiento de datos relativamente sencillo, con el que se obtiene información relevante respecto a la fuerza de interacción del fármaco en los sitios de unión de la proteína, así como la estequiometría en la formación del complejo, la distribución del fármaco en los distintos sitios de unión de la proteína y en disolución, etc.<sup>37</sup> Esto es posible ya que las propiedades de las especies transitorias generadas tales como rendimientos cuánticos, tiempos de vida, etc., tanto de la proteína como del fármaco pueden cambiar notablemente de estar libres en disolución a estar formando el complejo fármaco@proteína. En este sentido, tanto la espectrofotometría de fluorescencia como la técnica de fotólisis de destello láser permiten identificar cambios estructurales o procesos como transferencia de energía o de carga, etc., ofreciendo información relevante de este tipo de interacciones.<sup>37,44</sup> Así, existen antecedentes respecto a la relación entre la fotorreactividad del lapatinib y el daño fotoinducido que genera a las principales dianas celulares.<sup>26,29,45</sup>

## 1.5. COMPORTAMIENTO FOTOQUÍMICO DEL TKI LAPATINIB

Recientemente, el grupo de investigación donde he realizado mi tesis doctoral ha realizado un estudio completo sobre la fotorreactividad de lapatinib en diferentes microambientes, relacionándolo con el daño fotobiológico que genera a nivel celular (figura 1.14).<sup>26,29,45</sup> En dicho estudio se describe con detalle el comportamiento fotofísico de LAP y de sus principales metabolitos (N-LAP y O-LAP), identificándose las especies transitorias generadas en cada uno de ellos tanto en disolución orgánica como en medio biológico. En este sentido, se observaron diferencias importantes en función de los diferentes microambientes investigados; así, en disolución orgánica se generó principalmente el estado excitado localizado (*locally excited*, LE) singlete, el cual evolucionó rápidamente hacia la formación de un complejo de transferencia de carga intramolecular (*intramolecular charge transfer*, ICT), mientras que en HSA únicamente se generó el estado excitado LE singlete. La formación de ICT se debe a una disposición espacial perpendicular entre el furano y la quinazolina, permitiendo la transferencia de carga entre ambos anillos. Sin embargo, tanto LAP como N-LAP se disponen de forma coplanar en el interior del sitio de unión en HSA debido a restricciones conformacionales, lo que impide la formación del ICT, y además se observó un aumento del tiempo de vida de LE. En cuanto O-LAP, no se detectó emisión ya que las especies transitorias generadas se desactivaron por otras vías alternativas más rápidas, probablemente relacionadas con la desprotonación del fenol en su estado excitado.<sup>29</sup>

En relación con el daño biológico fotoinducido que generan el fármaco y sus metabolitos, se llevaron a cabo estudios *in vitro* para evaluar su

fototoxicidad y fotogenotoxicidad mediante ensayos de captación de rojo neutro (*neutral red uptake*, NRU) y ensayos de electroforesis en gel de células individuales o ensayo cometa (*comet*), respetivamente. En este sentido, LAP generó principalmente daño fotooxidativo a la membrana celular, mientras que N-LAP resultó ser principalmente fotogenotóxico.<sup>26,45</sup>



**Figura 1.14.** Resumen del estudio de la fotorreactividad de lapatinib: (A) Fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 320 \text{ nm}$ ) de LAP@HSA y LAP en PBS. (B) Espectro de absorción transitoria en escala de femtosegundos en acetonitrilo y (C) @HSA. (D) Imagen de microscopía confocal ( $\lambda_{\text{exc}} = 320 \text{ nm}$ ) de LAP@FSK (insertada: espectro de emisión de LAP@FSK). (E) Curvas dosis-respuesta de viabilidad celular para LAP@FSK (ensayo NRU). (F) Imagen de microscopía de fluorescencia de LAP@FSK con concentración 30  $\mu\text{M}$  (ensayo cometa).

Figura adaptada de las referencias 26, 29 y 45.

## 1.6. REFERENCIAS

- (1) International Agency for Research on Cancer. The Global Cancer Observatory - All Cancers Factsheet. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-factsheet.pdf>. (consultado el 14/10/2023).
- (2) Arruebo, M.; Vilaboa, N.; Sáez-Gutierrez, B.; Lambea, J.; Tres, A.; Valladares, M.; González-Fernández, Á. Assessment of the Evolution of Cancer Treatment Therapies. *Cancers*. **2011**, 3279–3330.
- (3) Falzone, L.; Salomone, S.; Libra, M. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*(1300).
- (4) Mendelsohn, J.; Baselga, J. The EGF Receptor Family as Targets for Cancer Therapy. *Oncogene* **2000**, *19*.
- (5) Uribe, M. L.; Marrocco, I.; Yarden, Y. EGFR in Cancer: Signaling Mechanisms, Drugs, and Acquired Resistance. *Cancers* **2021**, *13*, 27–48.
- (6) Benedí, J.; Gómez del Río, M. Á. Fármacos Antineoplásicos (I). *Farmacia profesional* **2006**, *20*(2), 60–64.
- (7) Benedí, J.; Gómez del Río, M. Á. Fármacos (y II). *Farmacia Profesional* **2006**, *20*(3), 42–46.
- (8) Huang, L.; Jiang, S.; Shi, Y. Tyrosine Kinase Inhibitors for Solid Tumors in the Past 20 Years (2001–2020). *J. Hematol. Oncol.* **2020**, *13*(143).
- (9) Yamaoka, T.; Kusumoto, S.; Ando, K.; Ohba, M.; Ohmori, T. Receptor Tyrosine Kinase-Targeted Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*(11), 1–35.



- (10) Till, J. H.; Hubbard, S. R. Protein Tyrosine Kinase Structure and Function. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 373–398.
- (11) Pottier, C.; Fresnais, M.; Gilon, M.; Jérusalem, G.; Longuespée, R.; Sounni, N. E. Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer: Breakthrough and Challenges of Targeted Therapy. *Cancers* **2020**, *12* (3), 731.
- (12) Klapper, L. N.; Kirschbaum, M. H.; Sela, M.; Yarden, Y. Biochemical and Clinical Implications of the ErbB/HER Signaling Network of Growth Factor. *Adv. Cancer Res.* **2000**, *77*, 25–79.
- (13) Zhao, Z.; Bourne, P. E. Overview of Current Type I/II Kinase Inhibitors. In *Next Generation Kinase Inhibitors*; Saphiro, P., Ed.; Springer International Publishing, 2020; 13–28.
- (14) Roskoski, R. Small Molecule Inhibitors Targeting the EGFR/ErbB Family of Protein-Tyrosine Kinases in Human Cancers. *Pharmacol. Res.* **2019**, *139*, 395–411.
- (15) Macdonald, J. B.; Macdonald, B.; Golitz, L. E.; LoRusso, P.; Sekulic, A. Cutaneous Adverse Effects of Targeted Therapies: Part I: Inhibitors of the Cellular Membrane. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2015**, *72* (2), 203–218.
- (16) Luu, M.; Lai, S. E.; Patel, J.; Guitart, J.; Lacouture, M. E. Photosensitive Rash Due to the Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Erlotinib. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2007**, *23*, 42–45.
- (17) Shyam Sunder, S.; Sharma, U. C.; Pokharel, S. Adverse Effects of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy: Pathophysiology, Mechanisms and Clinical Management. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2023**, *8* (1), 262.

- (18) Stein, K. R.; Scheinfeld, N. S. Drug-Induced Photoallergic and Phototoxic Reactions. *Expert Opin. Drug Saf.* **2007**, *6* (4), 431–443.
- (19) Lembo, S.; Raimondo, A.; Conti, V.; Venturini, M. Photosensitivity and Cancer Immune-Targeted Therapies. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2020**, *36* (3), 172–178.
- (20) Di Bartolomeo, L.; Irrera, N.; Campo, G. M.; Borgia, F.; Motolese, A.; Vaccaro, F.; Squadrito, F.; Altavilla, D.; Condorelli, A. G.; Motolese, A.; Vaccaro, M. Drug-Induced Photosensitivity: Clinical Types of Phototoxicity and Photoallergy and Pathogenetic Mechanisms. *Front. Allergy* **2022**, *3*.
- (21) Monteiro, A. F.; Rato, M.; Martins, C. Drug-Induced Photosensitivity: Photoallergic and Phototoxic Reactions. *Clin. Dermatol.* **2016**, *34* (5), 571–581.
- (22) B. L. Diffey and I. E. Kochevar, *Photodermatology*, ed. H. W. Lim, H. H. Hönigsmann and J. L. M. Hawk, Informa Healthcare, USA, 1st edn, 2007.
- (23) Gonçalo, M. Phototoxic and Photoallergic Reactions. In *Contact Dermatitis*, Johansen, J., Mahler, V., Lepoittevin, JP., Frosch, P., Eds.; Springer International Publishing, 2019; 1–25.
- (24) Nihira, T.; Hagiwara, Y. Ketoprofen-Induced Photoallergic Dermatitis. *Pediatr. Int.* **2019**, *61* (6), 610–611.
- (25) Batrani, M.; Salhotra, M.; Kubba, A.; Agrawal, M. Imatinib Mesylate-Induced Pseudoporphyria in a Patient with Chronic Myeloid Leukemia. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* **2016**, *82* (6), 727–729.

- (26) García-Lainez, G.; Vayá, I.; Marín, M. P.; Miranda, M. A.; Andreu, I. In Vitro Assessment of the Photo(Geno)Toxicity Associated with Lapatinib, a Tyrosine Kinase Inhibitor. *Arch. Toxicol.* **2021**, *95* (1), 169–178.
- (27) Selvam, T. P.; Kumar, P. V. Quinazoline Marketed Drugs-A Review. *Res. Pharm.* **2011**, *1* (1), 1–21.
- (28) Nardi, G.; Lhiaubet-Vallet, V.; Miranda, M. A. Photosensitization by Imatinib. A Photochemical and Photobiological Study of the Drug and Its Substructures. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, *27* (11), 1990–1995.
- (29) Vayá, I.; Andreu, I.; Lence, E.; González-Bello, C.; Consuelo Cuquerella, M.; Navarrete-Miguel, M.; Roca-Sanjuán, D.; Miranda, M. A. Characterization of Locally Excited and Charge-Transfer States of the Anticancer Drug Lapatinib by Ultrafast Spectroscopy and Computational Studies. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26* (68), 15922–15930.
- (30) Kasha, M. Characterization of Electronic Transitions in Complex Molecules. *Discuss. Faraday Soc.* **1950**, *9*, 14–19.
- (31) Scaiano, J. C. (Tito). *Photochemistry Essentials*, American Chemical Society, 2021.
- (32) McNaught, A. D.; Wilkinson, A.; Chalk, S. J. *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, Gold, V., Ed.; International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC): Research Triangle Park, NC, 2019.
- (33) Montalti, M.; Credi, A.; Prodi, L.; Gandolfi, M. T.; Michl, J.; Balzani, V. *Handbook of Photochemistry*, 3rd edition.; CRC Press, Taylor and Francis Group: Boca Raton, FL, 2006.

- (34) Speiser, S. Photophysics and Mechanisms of Intramolecular Electronic Energy Transfer in Bichromophoric Molecular Systems: Solution and Supersonic Jet Studies. *Chem. Rev.* **1996**, *96* (6), 1953–1976.
- (35) Rehm, D.; Weller, A. Kinetics of Fluorescence Quenching by Electron and H-Atom Transfer. *Isr. J. Chem.* **1970**, *8* (2), 259–271.
- (36) Scaiano, J. C. A Beginners Guide to Understanding the Mechanisms of Photochemical Reactions: Things You Should Know If Light Is One of Your Reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2023**, *52* (18), 6330–6343.
- (37) Vayá, I.; Lhiaubet-Vallet, V.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. Photoactive Assemblies of Organic Compounds and Biomolecules: Drug-Protein Supramolecular Systems. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (12), 4102–4122.
- (38) Krasner, J. Drug-Protein Interaction. *Pediatr. Clin. North Am.* **1972**, *19* (1), 51–63.
- (39) Sudlow, G.; Birkett, D.; Wade, D. The Characterization of Two Specific Drug Binding Sites on Human Serum Albumin. *Mol. Pharmacol.* **1975**, *11* (6), 824.
- (40) Kragh-Hansen, U.; Tuan Giam Chuang, V.; Otagiri, M. Practical Aspects of the Ligand-Binding and Enzymatic Properties of Human Serum Albumin. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25* (6), 695–704.
- (41) Barbosa, S.; Taboada, P.; Mosquera, V. Fibrillation and Polymorphism of Human Serum Albumin. In *Bio-nanoimaging*, Uversky, V. N., Lyubchenko, Y. L., Eds.; Elsevier Inc., 2014; 345–362.
- (42) Taguchi, K.; Nishi, K.; Giam Chuang, V. T.; Maruyama, T.; Otagiri, M. Molecular Aspects of Human Alpha-1 Acid Glycoprotein — Structure

and Function. In *Acute Phase Proteins*, Janciauskiene, S., Ed.; InTech, 2013.

(43) Peters, T. Jr. *All About Albumin*; Elsevier, 1995.

(44) Gelamo, E. L.; Silva, C. H. T. P.; Imasato, H.; Tabak, M. Interaction of Bovine (BSA) and Human (HSA) Serum Albumins with Ionic Surfactants: Spectroscopy and Modelling. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1594* (1), 84–99.

(45) Andreu, I.; Lence, E.; González-Bello, C.; Mayorga, C.; Cuquerella, M. C.; Vayá, I.; Miranda, M. A. Protein Binding of Lapatinib and Its N- and O-Dealkylated Metabolites Interrogated by Fluorescence, Ultrafast Spectroscopy and Molecular Dynamics Simulations. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11* (576495).





## Capítulo 2. Objetivos







## 2.1. OBJETIVOS DEL TRABAJO

En vista de los antecedentes expuestos en el capítulo 1 sobre la relación entre la fotorreactividad de fármacos y el daño fotoinducido que pueden generar en el organismo, se ha seleccionado el TKI gefitinib (GFT) como objeto de estudio de esta tesis doctoral, el cual ha sido elegido por ser un fármaco de gran relevancia en el campo oncológico, pero del que se desconoce su fotorreactividad y la relación que puede haber con los efectos adversos que genera. En este sentido, existen estudios que proponen que este tipo de efectos no deseados pueden estar relacionados con la presencia del cromóforo quinazolina (resaltado en azul en la figura 1), el cual está presente en la estructura química de GFT, por lo que, en este caso, también podría ser responsable de desencadenar fenómenos de fotosensibilización al interactuar con luz UVA. Adicionalmente, se han seleccionado los principales metabolitos fotoactivos de GFT, *O*-desmorfolinopropil gefitinib (GFT-M1) y *O*-desmetil gefitinib (GFT-M2), para llevar a cabo un estudio similar al realizado con el fármaco, pues ambos mantienen el cromóforo quinazolina en su estructura química (figura 2.1) y, por tanto, podrían generar daño fotosensibilizado.

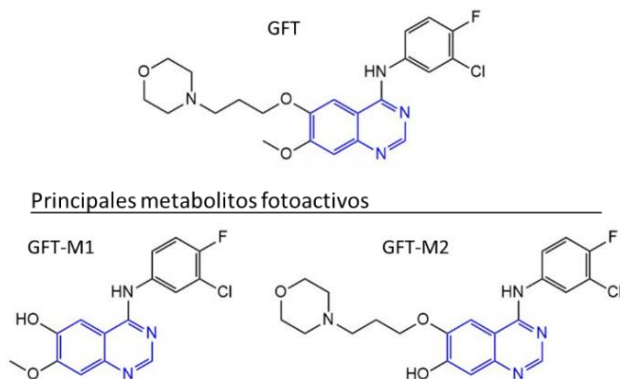


Figura 2.1. Estructura química de GFT y sus principales metabolitos fotoactivos.

Así pues, los objetivos establecidos para esta tesis doctoral son:

- Estudiar, de manera detallada, la fotorreactividad de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en disolución orgánica, utilizando diferentes disolventes orgánicos para investigar el efecto de la polaridad del medio sobre sus propiedades fotofísicas. Así, se pretende caracterizar las especies transitorias generadas tras la absorción de luz UV y describir sus principales propiedades fotofísicas mediante el uso de técnicas espectroscópicas en estado estacionario y de resolución temporal, a escala temporal desde los femtosegundos hasta los microsegundos.
- Investigar el comportamiento fotofísico de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en medio biológico. Para ello, se utilizarán proteínas modelo de origen humano tales como la albúmina sérica y la  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida (HSA y HAG, respectivamente), ya que son las proteínas transportadoras más abundantes e importantes en el plasma sanguíneo. Así pues, se caracterizarán con detalle las especies transitorias que se generan tras la excitación selectiva de GFT, GFT-M1 o GFT-M2 en el interior de cada proteína llevando a cabo un estudio espectroscópico similar al realizado en disolución orgánica.
- Por último, se estudiará el sitio de unión preferente y la fuerza de la interacción, así como las interacciones principales que se dan entre GFT, GFT-M1 y GFT-M2, y los aminoácidos presentes en las cavidades de HSA y de HAG. Para ello, se llevarán a cabo estudios teóricos de acoplamiento molecular (*molecular docking*, MD) en colaboración con la Prof. Concepción González Bello, y estudios espectroscópicos, tales como experimentos de desplazamiento con sondas de unión selectivas o el estudio de las interacciones competitivas entre el fármaco y sus metabolitos por espectroscopía de fluorescencia, con el fin de conocer el modo y la fuerza de unión, así como la orientación del fármaco y de sus metabolitos en el interior de HSA y HAG.

Con todo ello, se pretende establecer una correlación entre la fotorreactividad de GFT, GFT-M1 y GFT-M2, y el daño fotoinducido que generan a las principales dianas celulares (ADN, lípidos y proteínas). De este modo, se espera poder contribuir al campo de la oncología aportando información complementaria sobre las reacciones de fotosensibilización que puede sufrir un paciente tratado con GFT, con el fin de priorizar siempre su seguridad.





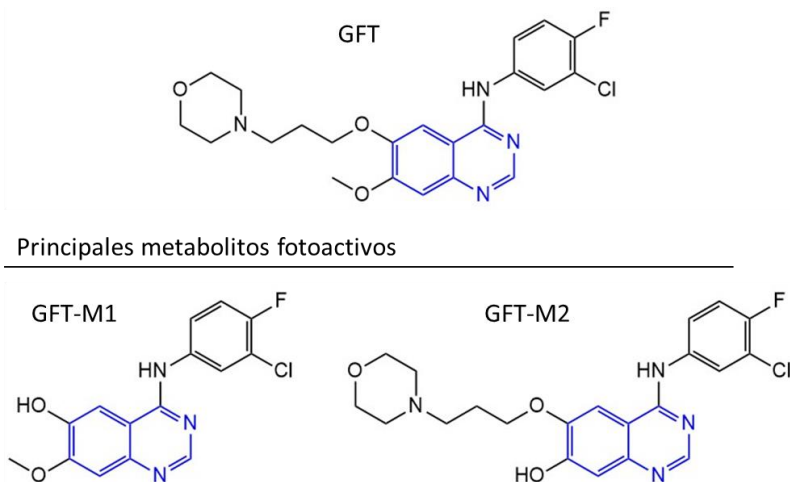
**Capítulo 3.** Caracterización de los estados excitados de gefitinib y de sus metabolitos fenólicos en disolución orgánica





### 3.1. INTRODUCCIÓN

El gefitinib (GFT) es un fármaco relevante en el campo oncológico que actualmente se utiliza en terapia contra el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) en estado avanzado o metastásico, dando una opción de tratamiento a aquellos casos en los que la quimioterapia no es efectiva.<sup>1</sup> Así, GFT pertenece al grupo de los inhibidores tirosina quinasa (TKIs) de tipo I, el cual actúa uniéndose al sitio del ATP del receptor HER1, inhibiendo la actividad de la tirosina quinasa y, por tanto, el crecimiento celular descontrolado, evitando la formación de tumores.<sup>2,3</sup> Este fármaco sufre una biotransformación en el organismo *vía* hepática de fase I dando lugar a diferentes metabolitos, entre los que cabe destacar el *O*-desmorfolinopropil gefitinib (GFT-M1) y el *O*-desmetil gefitinib (GFT-M2),<sup>1,4</sup> cuya estructura química se muestra en la figura 3.1.



**Figura 3.1.** Estructuras químicas de GFT y sus principales metabolitos fotoactivos. En azul se resalta el cromóforo quinazolina.

Existen casos clínicos de pacientes tratados con GFT que muestran efectos adversos, entre los que cabe destacar diarrea, sequedad en la piel,

erupciones cutáneas, acné, náuseas o vómitos como síntomas leves, y en algunos casos aislados, incluso el desarrollo de la enfermedad intersticial de pulmón (*intersticial lung disease*, ILD).<sup>5</sup> En relación a los efectos secundarios que pueden producir algunos fármacos, se sabe que aquellos que contienen el cromóforo quinazolina en su estructura son capaces de inducir daño fotosensibilizado tras absorber luz solar, el cual está principalmente relacionado con la fotodermatitis.<sup>6</sup> En este sentido, recientemente se ha demostrado que tanto GFT como sus dos metabolitos GFT-M1 y GFT-M2, que contienen dicho cromóforo, resaltado en azul en la figura 3.1, son capaces de generar daño fotosensibilizado a biomoléculas tales como lípidos, proteínas y ADN, así como producir daño celular.<sup>7</sup> En dicho trabajo de investigación, realizado en el grupo en el que se ha desarrollado esta tesis doctoral, se concluye que, mientras que GFT genera principalmente daño fotooxidativo a proteínas, su principal metabolito GFT-M1 es mucho más fototóxico y reacciona principalmente con lípidos. Sin embargo, GFT-M2 también genera daño a proteínas, aunque en menor medida, produciendo principalmente daño fotosensibilizado al ADN.<sup>7</sup>

En vista del daño fotoinducido que puede generar tanto el fármaco como sus metabolitos, y dado que no existen estudios acerca de la fotorreactividad de éstos que pueda justificar la foto(geno)toxicidad observada, se va a investigar con detalle las especies transitorias generadas y los procesos fotofísicos que pueden ocurrir tras la interacción de GFT y sus dos metabolitos fotoactivos GFT-M1 y GFT-M2 con luz UV-A (figura 3.1) en disolventes orgánicos de distinta polaridad. Para ello, se utilizarán distintas técnicas espectroscópicas, tales como la



Capítulo 3. Caracterización de los estados excitados de gefitinib y de sus  
metabolitos fenólicos en disolución orgánica

---

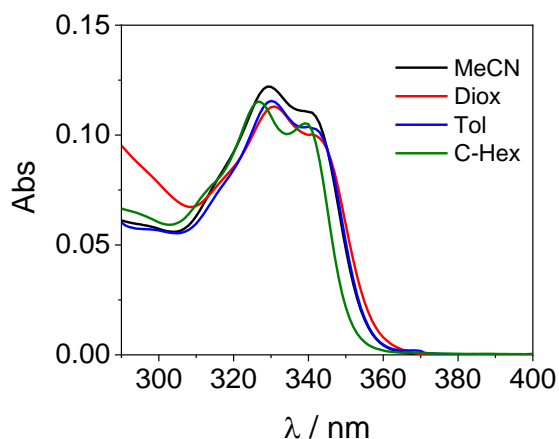
espectroscopía de fluorescencia y de absorción transitoria, desde la escala de femtosegundo a microsegundo.

## 3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se van a presentar los resultados obtenidos para GFT, y, posteriormente, se mostrarán los de sus metabolitos GFT-M1 y GFT-M2. De esta forma se realizará un estudio comparativo de la fotorreactividad de las tres moléculas en medio orgánico.

### 3.2.1. Estudio fotofísico de GFT

En primer lugar, se registraron los espectros de absorción UV de GFT en disolventes orgánicos de distinta polaridad: acetonitrilo, 1,4-dioxano, tolueno y ciclohexano (figura 3.2).



**Figura 3.2.** Espectros de absorción UV de GFT 10 μM en acetonitrilo (negro), 1,4-dioxano (rojo), tolueno (azul) y ciclohexano (verde).

Como se puede observar, no se aprecian diferencias significativas en cuanto a la principal banda de absorción del fármaco, por lo que sus propiedades en el estado fundamental apenas se ven afectadas por la polaridad del medio. Por el contrario, sí se observan diferencias significativas en la fluorescencia de GFT en función del disolvente. En este

sentido, la figura 3.3 muestra los espectros de emisión del fármaco tras ser irradiado a 340 nm ( $A_{340} = 0.1$ ).

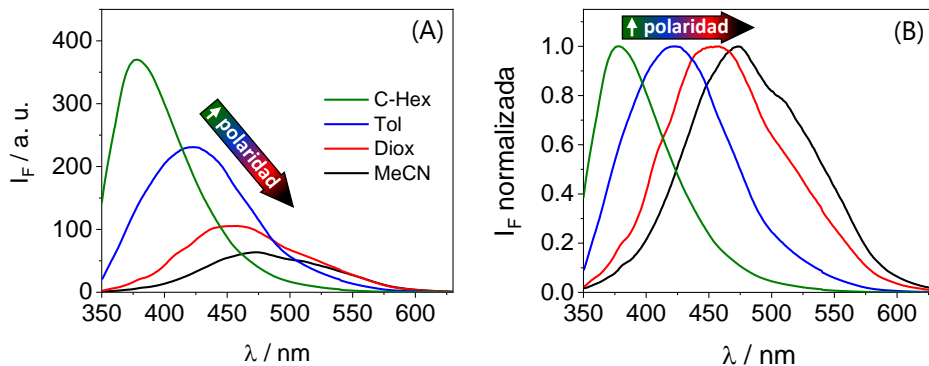
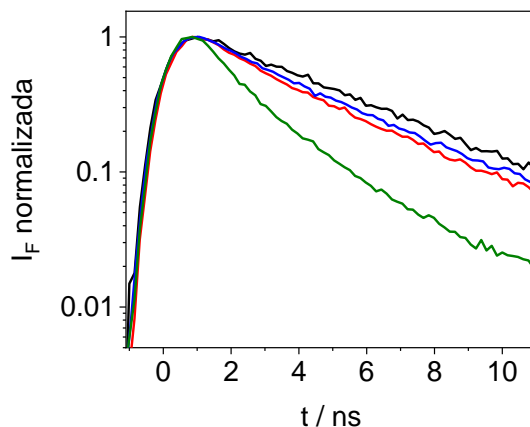


Figura 3.3. (A) Espectros de fluorescencia de GFT en ciclohexano (verde), tolueno (azul), 1,4-dioxano (rojo) y acetonitrilo (negro) tras excitar a 340 nm. (B) Espectros normalizados.

Los espectros de fluorescencia de GFT son más desestructurados y presentan una anchura (*full width at half maximum*, fwhm) mayor conforme aumenta la polaridad del disolvente. Además, en medio más polar, el máximo de emisión se va desplazando hacia longitudes de onda mayores, con rendimientos cuánticos de fluorescencia ( $\phi_F$ ) considerablemente menores. Los perfiles cinéticos muestran que la fluorescencia del fármaco desaparece más rápidamente en disolventes apolares (ver figura 3.4). Los valores de tiempos de vida media de fluorescencia ( $\tau_F$ ) en los distintos disolventes (ver tabla 3.1) se determinaron ajustando las cinéticas de desaparición mediante un procedimiento de ajuste/deconvolución no lineal utilizando una función monoexponencial; este punto se explica detalladamente en el anexo II. Como se puede observar, los valores de  $\tau_F$  son mayores en medios más polares.



**Figura 3.4.** Cinéticas de desaparición de la fluorescencia de GFT (10  $\mu$ M) en acetonitrilo (negro), 1,4-dioxano (rojo), tolueno (azul) y ciclohexano (verde) tras excitar a 340 nm.

**Tabla 3.1.** Propiedades de fluorescencia de GFT ( $\lambda_{exc} = 340$  nm) en disolventes orgánicos de distinta polaridad.

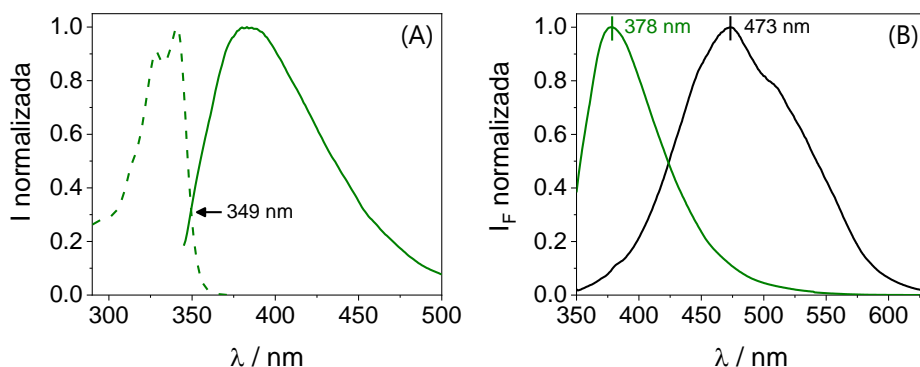
Disolvente	$\phi_F$	$\tau_F$ (ns)	fwhm (nm)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)
Acetonitrilo	0.05	3.4	118	473
1,4-Dioxano	0.09	2.5	116	458
Tolueno	0.18	2.6	101	421
Ciclohexano	0.19	1.3	71	378

Las propiedades de fluorescencia de GFT no se ven afectadas por la presencia o ausencia de oxígeno en el medio; los tiempos de vida de fluorescencia son muy cortos como para que ésta se pueda desactivar por interacción del fármaco con oxígeno molecular.

Los resultados obtenidos indican que la irradiación de GFT podría dar lugar a la formación de especies distintas en el estado excitado en

disolventes polares y apolares. Por comparativa con resultados previamente publicados sobre el comportamiento fotofísico de otro inhibidor de la tirosina quinasa como es lapatinib (LAP),<sup>8</sup> las distintas especies que se pueden formar tras irradiar GFT a 340 nm podrían atribuirse a estados localizados (*locally excited*, LE) de naturaleza singlete en medios apolares, mientras que en medios polares se formarían principalmente estados de transferencia de carga intramolecular (*intramolecular charge transfer*, ICT). En este sentido, se han determinado las energías de las especies LE e ICT de la siguiente forma:

- Para los estados LE, su energía se ha determinado a partir de la longitud de onda correspondiente a la intersección entre los espectros de emisión y de excitación normalizados (349 nm) en ciclohexano (figura 3.5A), obteniéndose un valor de 82 kcal/mol.
- Para los estados ICT, se ha realizado una estimación de su energía a partir del desplazamiento batocrómico entre los máximos de los espectros de emisión en ciclohexano, donde se forman estados LE, y acetonitrilo, donde se forman principalmente estados ICT (ver figura 3.5B), obteniéndose un valor de 64 kcal/mol.



**Figura 3.5.** (A) Espectros normalizados de emisión a  $\lambda_{\text{exc}} = 340$  nm (línea sólida) y de excitación a  $\lambda_{\text{em}} = 378$  nm (línea discontinua) de GFT en ciclohexano. (B) Espectros de emisión normalizados de GFT en acetonitrilo (negro) y ciclohexano (verde) tras excitar a 340 nm.

Con el fin de estudiar en mayor profundidad la naturaleza de los estados LE e ICT, se midieron los espectros de fluorescencia de GFT en matriz sólida en disolvente apolar (ciclohexano) y polar (etanol) a 77 K. Conviene mencionar que las medidas no se pudieron realizar en acetonitrilo como disolvente más polar puesto que éste no forma cristales con la transparencia apropiada, por lo que se utilizó etanol.

La excitación de GFT en matriz sólida de ciclohexano (figura 3.6) genera una única banda de emisión con máximo a 370 nm, la cual se asemeja bastante a la obtenida a temperatura ambiente. Así pues, esta especie se asocia a estados LE de naturaleza singlete del fármaco ( $^1\text{GFT}^*$ ). Sin embargo, el espectro registrado en matriz sólida de etanol presenta dos bandas claramente diferenciadas: la primera de ellas, más energética, coincide con la emisión observada para LE en ciclohexano, por lo que se asigna a la misma especie, mientras que la segunda banda, desplazada hacia longitudes de onda mayores, se asocia a la emisión de ICT. De hecho,

su energía de formación, la cual se puede estimar a partir de la longitud de onda correspondiente al primer máximo de emisión ( $\lambda = 440$  nm), es de 65 kcal/mol. Este valor coincide con el estimado anteriormente a partir del desplazamiento batocrómico observado a temperatura ambiente.

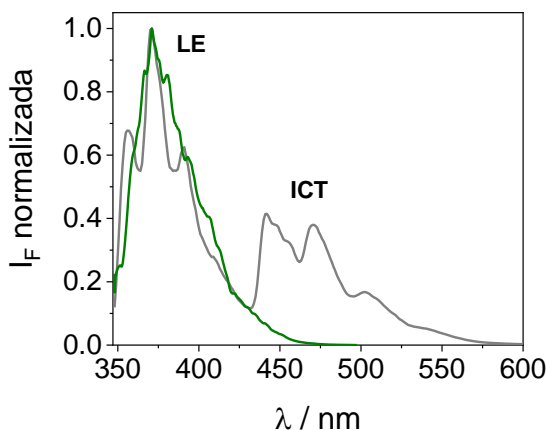


Figura 3.6. Espectros de fluorescencia normalizados de GFT en matriz sólida (77 K) de ciclohexano (verde) y etanol (gris) a  $\lambda_{exc} = 340$  nm.

La formación de los estados LE e ICT se investigó con mayor detalle haciendo uso de la técnica de absorción transitoria a escala de femtosegundo (*femtosecond transient absorption*, FTA). Esta técnica es muy sensible y permite estudiar la formación de especies transitorias, así como la evolución de procesos fotofísicos, a escala temporal ultrarrápida, de femtosegundos a picosegundos, como es el cruce intersistema, la transferencia de energía y/o electrónica o la transferencia de protón.<sup>9-11</sup>

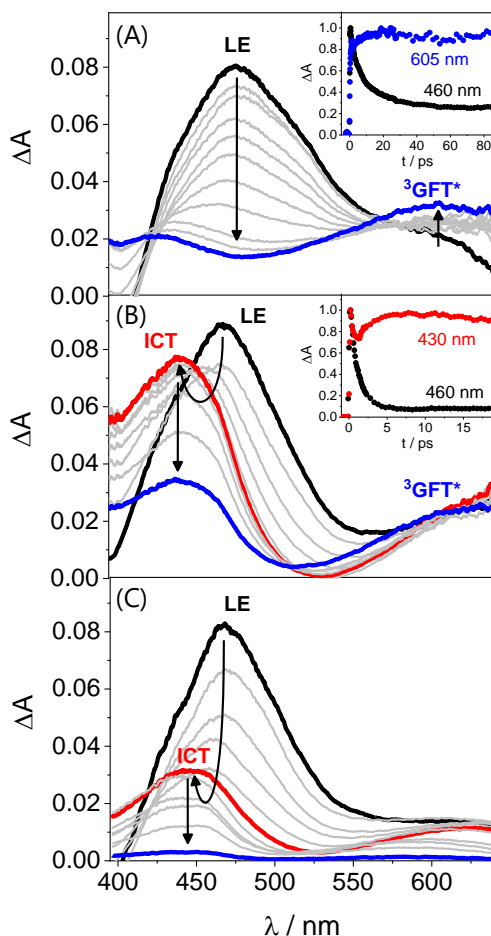
En la figura 3.7A se muestran los espectros de absorción transitoria de GFT en tolueno tras excitar a 330 nm. Así, se observa la formación instantánea de una banda de absorción centrada a  $\sim 460$  nm (traza negra), la cual evoluciona a través de dos puntos isobéuticos (ca. 415 nm y 560 nm)

hacia la formación de una nueva banda de absorción con máximos sobre 410 nm y 605 nm (traza azul), que permanecen hasta la escala de ns. Esta nueva banda se forma en un tiempo aproximado de unos 10 ps, como se puede observar de las cinéticas de la figura 3.7A. La banda con máximo a  $\sim 460$  nm se asigna a la absorción de  $^1\text{GFT}^*$ , mientras que la que persiste hasta la escala de nanosegundos, con máximos *ca.* 410 y 605 nm, podría asignarse tentativamente a la absorción del estado excitado triplete de gefitinib ( $^3\text{GFT}^*$ ).

Adicionalmente, se realizaron medidas de FTA en acetonitrilo (ver figura 3.7B). Al igual que en tolueno, se observa la formación instantánea de una banda con máximo *ca.* 460 nm (traza negra en figura 3.7B), la cual evoluciona en  $\sim 1$  ps hacia la formación de otra banda centrada a  $\sim 430$  nm (traza roja en figura 3.7B), indicando la formación de otra especie. Este comportamiento es muy similar al observado previamente para LAP en MeCN, donde se forman estados ICT a partir de estados LE en un tiempo de unos 1.5 ps, los cuales permanecen hasta la escala de nanosegundos.<sup>8</sup> De manera análoga, las bandas observadas para GFT se atribuyen a estados ICT, con máximos *ca.* 430 nm, formados a partir de estados LE ( $\lambda_{\text{máx}} \sim 460$  nm) en disolventes polares. Para GFT en acetonitrilo también se observa la formación de una banda con máximos en torno a 410 y 605 nm, la cual se asigna a la formación de  $^3\text{GFT}^*$ . Este estado triplete se formaría directamente por un proceso de cruce intersistemas (ISC) a partir de estados LE en el caso del tolueno, mientras que en acetonitrilo se formaría preferentemente a partir de estados ICT.

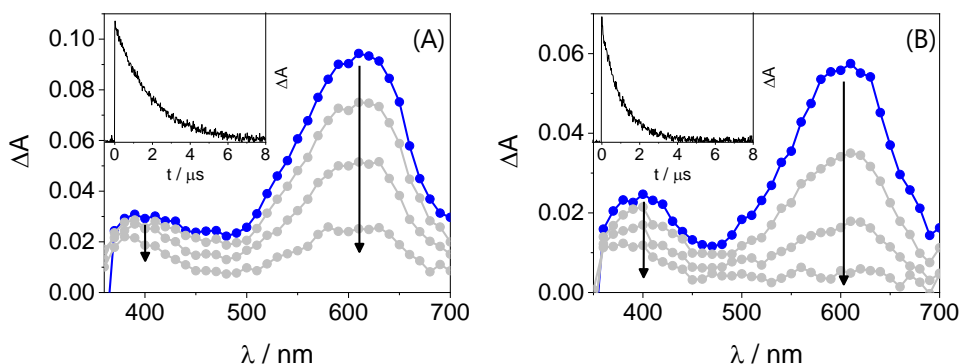


Análogamente a tolueno y acetonitrilo, se realizaron medidas de FTA del fármaco en etanol, observándose un comportamiento inicial muy similar al de acetonitrilo, pero con tiempos de vida mucho más cortos (*ca.* 700 ps). Sorprendentemente, la banda asociada a  $^3\text{GFT}^*$  ( $\lambda_{\text{máx}} \sim 410$  y 605 nm) no se forma en este disolvente.



**Figura 3.7.** Espectros FTA ( $\lambda_{\text{exc}} = 330$  nm) de GFT en (A) tolueno, de 1 ps (negro) a 2 ns (azul), (B) acetonitrilo, de 1 ps (negro) a 2 ns (azul) y (C) etanol, de 0.5 ps (negro) a 700 ps (azul). Los perfiles cinéticos monitorizados a distintas longitudes de onda se muestran como figuras insertadas en (A), donde se observa el proceso de ISC, y (B), donde se observa la formación de estados ICT a partir de LE.

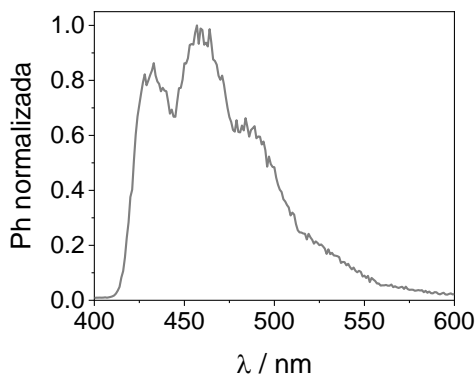
Con el fin de caracterizar con mayor detalle los estados excitados del fármaco a escalas de tiempo mayores ( $\mu\text{s}$ ), se llevaron a cabo medidas de fotólisis de destello láser (LFP) a  $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ . Como se puede observar en la figura 3.8A, el espectro de absorción transitoria registrado en tolueno muestra dos bandas con máximos sobre 400 y 600 nm, las cuales se asemejan mucho a las observadas en FTA a escala de ns. La evolución temporal de estas dos bandas es muy similar, por lo que se pueden asignarse al mismo estado excitado. El comportamiento que se observó en acetonitrilo (figura 3.8B) es parecido al observado en tolueno, sólo que el tiempo de vida de desaparición de la especie a 600 nm es de  $1.7 \mu\text{s}$ , mientras que en tolueno es ligeramente superior, de  $2 \mu\text{s}$ .



**Figura 3.8.** Espectros de LFP de 0.2 a 3  $\mu\text{s}$  en atmósfera de  $\text{N}_2$  ( $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ ) para GFT en (A) tolueno y (B) acetonitrilo. Las cinéticas de desaparición a 600 nm se muestran en las figuras insertadas.

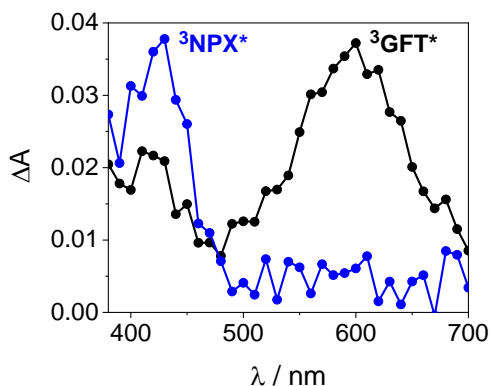
Para poder confirmar que la especie transitoria con un máximo de absorción a 600 nm corresponde a  $^3\text{GFT}^*$ , se llevaron a cabo experimentos adicionales de LFP a  $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ , incluyendo la desactivación con oxígeno molecular y estudios de fotosensibilización. Así pues, la señal a 600 nm se desactivó por  $\text{O}_2$ , obteniéndose un valor de  $K_Q \sim 5.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$

$s^{-1}$ . Este valor se determinó a partir del análisis Stern-Volmer (ecuación 3.1), explicado en detalle en el punto 3.4.3 de este capítulo.

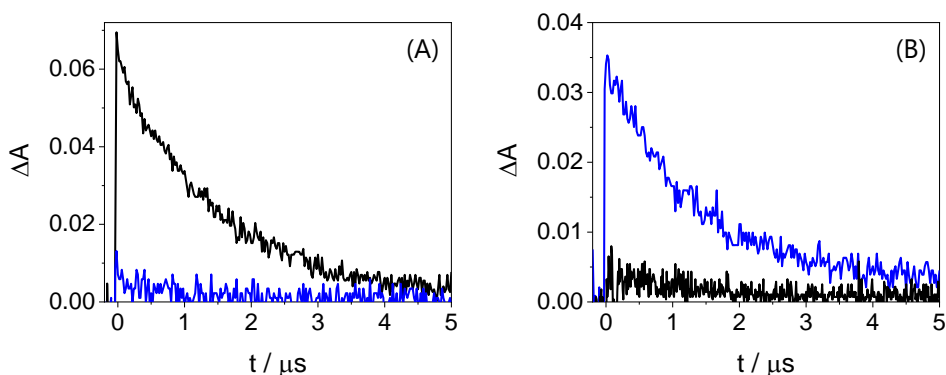


**Figura 3.9.** Espectro de fosforescencia de GFT en matriz sólida de etanol (77 K) tras excitar a 340 nm.

Adicionalmente, se realizaron experimentos de fotosensibilización utilizando naproxeno (NPX) como aceptor, que es un fármaco cuyo estado excitado triplete es bien conocido. Así, NPX tiene una energía de triplete ( $E_T$ ) de 62 kcal/mol y presenta un máximo de absorción a 440 nm.<sup>9</sup> Esta energía es inferior a la del gefitinib (69 kcal/mol), la cual se determinó a partir del valor de la longitud de onda correspondiente al 4% de la subida del espectro de fosforescencia registrado en matriz sólida de EtOH (figura 3.9). La excitación selectiva de GFT a 355 nm en presencia de NPX induce una fuerte desactivación de la señal a 600 nm, con la consiguiente formación de  ${}^3\text{NPX}^*$  ( $\lambda_{\text{máx}} \sim 430$  nm) a través de un proceso de transferencia de energía triplete-triplete (*triplet-triplet energy transfer*, TTET) del dador, GFT, al aceptor, NPX (ver figuras 3.10 y 3.11). Estos resultados confirman la naturaleza triplete de la señal a 600 nm obtenida tras excitar GFT.



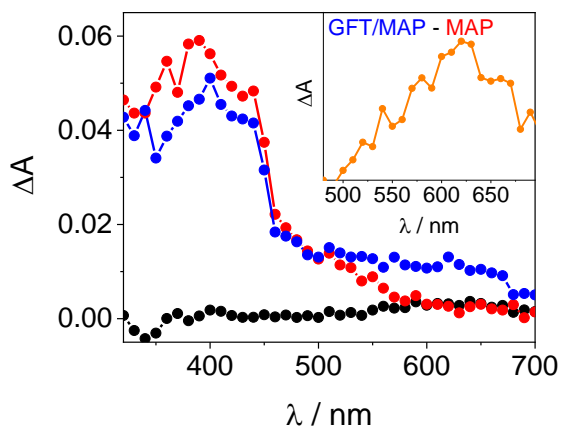
**Figura 3.10.** Espectros de absorción transitoria registrados 0.2  $\mu\text{s}$  tras el pulso del láser de GFT (traza negra) y de una mezcla conteniendo GFT y NPX (traza azul). Las medidas se realizaron en atmósfera inerte de acetonitrilo tras excitar a 355 nm.



**Figura 3.11.** Cinéticas de desaparición monitorizadas a (A) 600 nm y (B) 430 nm tras excitar selectivamente a GFT a 355 nm en MeCN/N<sub>2</sub> en ausencia (negro) y presencia (azul) de NPX.

Es importante resaltar que el estado excitado triplete del fármaco puede formarse en disolventes orgánicos apolares y polares a partir de distintos precursores. Así, la irradiación de GFT en disolventes apolares induce la formación de estados LE, que evolucionan hacia la formación de  $^3\text{GFT}^*$  a través de un proceso ISC que tiene lugar en *ca.* 10 ps. Por el contrario, en disolventes más polares, como acetonitrilo, se forman estados ICT en  $\sim 1$

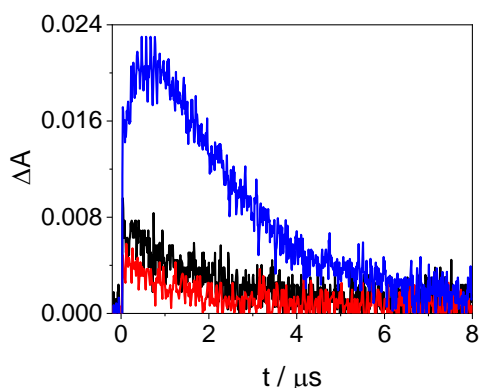
ps, los cuales evolucionan para formar  $^3\text{GFT}^*$ . Sorprendentemente, y como se ha comentado con anterioridad, la irradiación directa de GFT en etanol no genera  $^3\text{GFT}^*$ . Esto puede deberse a una mayor estabilización de los estados ICT (65 kcal/mol) respecto a  $^3\text{GFT}^*$  (69 kcal/mol) en este disolvente convirtiendo el proceso ISC en endotérmico. Sin embargo, sí se consiguió formar  $^3\text{GFT}^*$  en etanol con mayor eficiencia a través de un proceso TTET utilizando 2-metoxiacetofenona (MAP) como fotosensibilizador.<sup>12</sup> Así pues, la excitación selectiva de MAP ( $E_T = 76$  kcal/mol) a 355 nm en una mezcla conteniendo GFT y MAP en etanol en atmósfera de nitrógeno, da lugar a la formación de  $^3\text{GFT}^*$  (figura 3.12, donde la figura insertada es la diferencia entre los espectros azul y rojo) por un proceso TTET de  $^3\text{MAP}^*$ , que actúa como dador, a GFT, que es el acepto.



**Figura 3.12.** Espectros de absorción transitoria registrados 0.6  $\mu\text{s}$  tras el pulso del láser ( $\lambda_{\text{exc}} = 355$  nm) de GFT (negro), MAP (rojo) y de una mezcla GFT/MAP (azul) en etanol/ $\text{N}_2$ .

El espectro insertado (naranja) muestra la resta de los espectros azul menos rojo.

El perfil cinético en la figura 3.13 muestra el crecimiento y la desaparición de las especies a 600 nm.



**Figura 3.13.** Perfiles cinéticos a 610 nm de GFT (negro), MAP (rojo) y de una mezcla GFT/MAP (azul). Todas las medidas se realizaron en atmósfera inerte de etanol a  $\lambda_{exc} = 355$  nm; la concentración de GFT y MAP fue de 40  $\mu$ M y 30 mM, respectivamente.

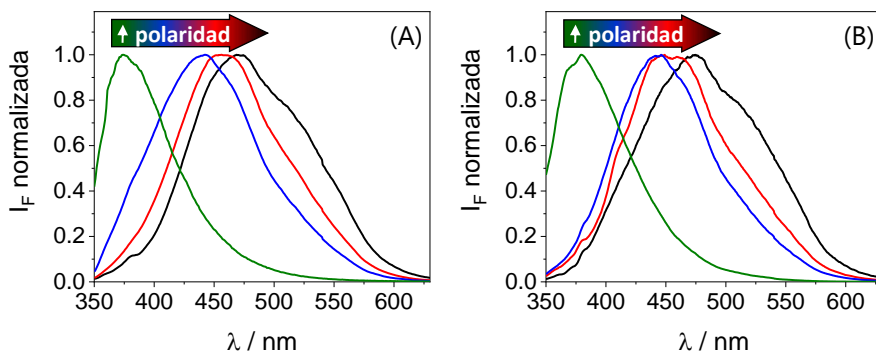
Finalmente, desde un punto de vista biológico, el estado excitado triplete es una especie de gran relevancia debido a que puede inducir daño a proteínas y a otras dianas moleculares a través de distintos mecanismos: en el mecanismo de tipo I, se generan especies radicalarias a partir de un proceso de transferencia electrónica o de abstracción de hidrógeno. Por otro lado, en el mecanismo de tipo II, tiene lugar un proceso de transferencia de energía principalmente desde el estado excitado triplete de un fotosensibilizador al oxígeno molecular, dando lugar a la formación de oxígeno singlete ( $^1O_2$ , mecanismo de tipo II).<sup>13</sup> En este contexto, se ha observado por medio de la técnica LFP que la excitación del fármaco a 355 nm genera  $^3GFT^*$ , que induce la formación de  $^1O_2$  del cual se ha detectado su emisión cercana al infrarrojo (*near infrared emission*, NIR) a 1270 nm. De esta forma se han obtenido, siguiendo la metodología detallada en el punto 3.4.5, valores de rendimientos cuánticos de formación de oxígeno singlete ( $\phi(^1O_2)$ ) para GFT en tolueno y acetonitrilo

en medio aeróbico de 0.17 y 0.1, respectivamente. Estos valores concuerdan con la mayor formación de  $^3\text{GFT}^*$  en tolueno.

A continuación, se van a mostrar los resultados obtenidos para los principales metabolitos fotoactivos del fármaco, GFT-M1 y GFT-M2.

### 3.2.2. Estudio fotofísico de GFT-M1 y GFT-M2

En primer lugar, se midieron los espectros de absorción UV de los dos metabolitos en los distintos disolventes orgánicos. En ambos casos, y como ya se observó con GFT, estos apenas variaron con la polaridad del medio. Sin embargo, la fluorescencia tanto de GFT-M1 como de GFT-M2 sí se vio alterada en función del disolvente empleado. De forma análoga a como se procedió con el fármaco, las medidas de fluorescencia de los metabolitos se realizaron a  $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ .



**Figura 3.14.** Espectros de fluorescencia de (A) GFT-M1 y (B) GFT-M2 en acetonitrilo (negro), 1,4-dioxano (rojo), tolueno (azul) y ciclohexano (verde) tras excitar a 340 nm.

Como se puede observar en la figura 3.14, los espectros de fluorescencia de los metabolitos en medio apolar muestran anchos de banda menores y máximos de emisión a longitudes de onda más bajas que en disolventes más polares como acetonitrilo, donde el espectro de emisión es más

desestructurado, con  $\lambda_{\text{máx}} \sim 475$  nm. Análogamente a lo observado con GFT, los rendimientos cuánticos de fluorescencia resultaron ser mayores en disolventes apolares, obteniéndose tiempos de vida menores que en un medio más polar. La tabla 3.2 muestra una comparativa de las propiedades de fluorescencia de GFT con GFT-M1 y GFT-M2.

Tabla 3.2. Propiedades de fluorescencia de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en disolventes orgánicos de distinta polaridad tras excitar a 340 nm.

	Disolvente	$\phi_F$	$\tau_F$ (ns)	fwhm (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
GFT	Acetonitrilo	0.05	3.4	118	473
	1,4-Dioxano	0.09	2.5	116	458
	Tolueno	0.18	2.6	101	421
	Ciclohexano	0.19	1.3	71	378
GFT-M1	Acetonitrilo	0.03	3.2	121	468
	1,4-Dioxano	0.08	3.1	107	456
	Tolueno	0.14	2.9	107	442
	Ciclohexano	0.16	1.2	69	375
GFT-M2	Acetonitrilo	0.05	2.7	129	475
	1,4-Dioxano	0.09	2.5	108	455
	Tolueno	0.11	2.3	95	445
	Ciclohexano	0.13	0.8	74	380

Con todo ello, se puede concluir que las especies generadas tras la excitación de GFT-M1 y GFT-M2 en disolución orgánica son las mismas que las caracterizadas anteriormente para GFT; es decir, se forman estados



LE en disolventes apolares y estados ICT en disolventes más polares. Con el fin de estudiar con mayor detalle las especies transitorias que se generan al irradiar los metabolitos con luz UV-A, así como de profundizar en los procesos fotoinducidos que pueden ocurrir, se realizaron estudios de absorción transitoria de escala de femtosegundo a microsegundo.

En primer lugar, se realizaron experimentos de FTA para GFT-M1 en acetonitrilo tras excitar a 330 nm. Tal y como se muestra en la figura 3.15, el comportamiento es muy similar al de GFT: la excitación de GFT-M1 induce la formación de una banda sobre 480 nm que evoluciona rápidamente hacia la formación de otra banda centrada en  $\sim 435$  nm, proceso que tiene lugar en un tiempo de unos 2.4 ps (ver figura 3.15B); esta especie permanece hasta la escala de nanosegundos. Por comparativa con el comportamiento de GFT, estas bandas son asignadas a estados LE ( $\lambda_{\text{máx}} \sim 480$  nm, traza negra de la figura 3.15) los cuales evolucionan hacia la formación de estados ICT ( $\lambda_{\text{máx}} \sim 435$  nm, traza roja de la figura 3.15). Por último, se observó la formación de una nueva banda centrada en  $\sim 610$  nm (traza azul de la figura 3.15A) que perdura hasta la escala de los nanosegundos, la cual se asignó al estado excitado triplete del metabolito ( $^3\text{GFT-M1}^*$ ).

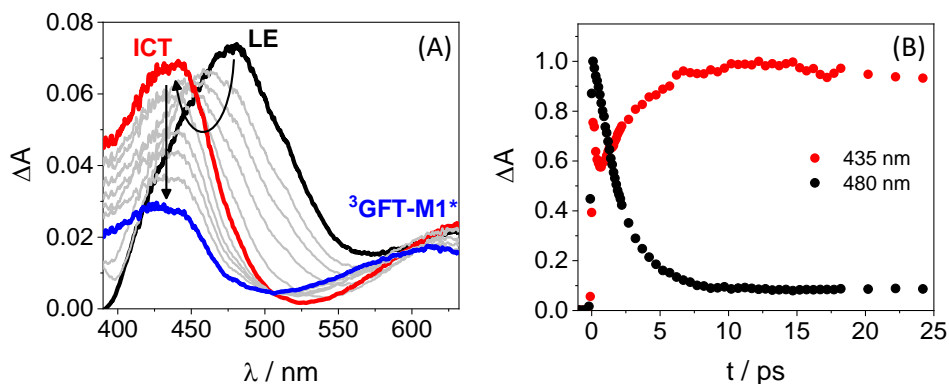


Figura 3.15. (A) Espectros de FTA de 0.5 ps a 2 ns para GFT-M1. (B) Perfiles cinéticos de GFT-M1 a 480 nm (negro) y 435 nm (rojo). Medidas realizadas en acetonitrilo tras excitar a 330 nm.

Con el fin de estudiar las especies transitorias que se forman a escalas de tiempo mayores, se realizaron medidas de LFP a  $\lambda_{\text{exc}} = 355$  nm. En las figuras 3.16 y 3.17 se muestran los espectros de LFP para GFT-M1 y GFT-M2, respectivamente, en tolueno y acetonitrilo.

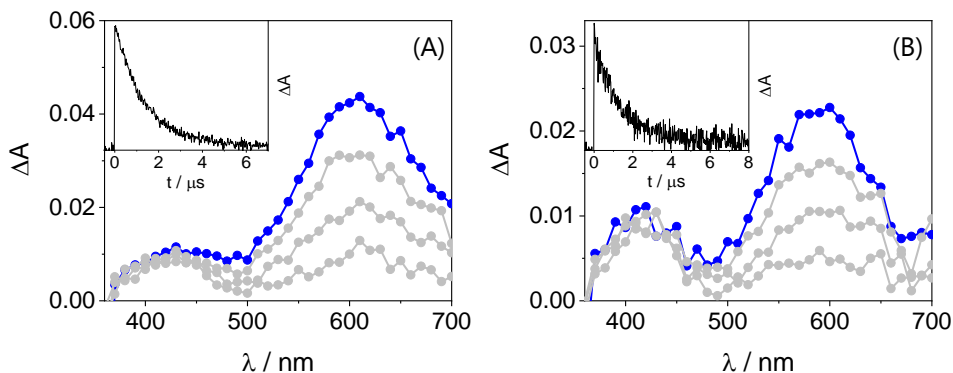
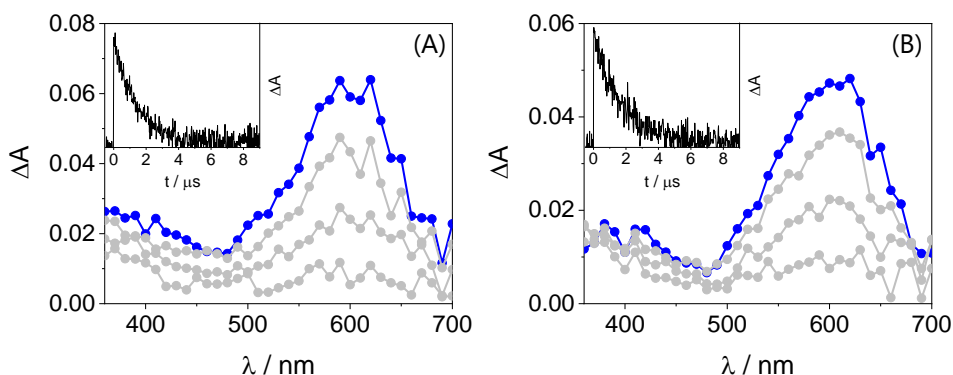


Figura 3.16. Espectros de LFP de 0.2 a 3.0  $\mu\text{s}$  tras el pulso del láser para GFT-M1 en (A) tolueno y (B) acetonitrilo. Medidas realizadas en atmósfera de  $\text{N}_2$  tras excitar a 355 nm.



**Figura 3.17.** Espectros de LFP de 0.2 a 3.0  $\mu\text{s}$  tras el pulso del láser para GFT-M2 en (A) tolueno y (B) acetonitrilo. Medidas realizadas en atmósfera de  $\text{N}_2$  tras excitar a 355 nm.

Los espectros obtenidos son muy similares a los observados anteriormente para GFT. Por tanto, la banda con máximo a  $\sim 600$  nm se asigna a los estados excitados triplete de GFT-M1 y GFT-M2, respectivamente. Conviene destacar que los espectros obtenidos en tolueno y acetonitrilo son muy parecidos, por lo que  $^3\text{GFT-M1}^*$  y  $^3\text{GFT-M2}^*$  se pueden generar directamente por cruce intersistemas de estados LE en medio apolar, o a partir de estados ICT en medio polar. Los valores de tiempos de vida media de  $^3\text{GFT-M1}^*$  y  $^3\text{GFT-M2}^*$  son parecidos a los obtenidos para  $^3\text{GFT}^*$  (ver tabla 3.3).

En relación con el daño biológico fotoinducido que generan ambos metabolitos,<sup>7</sup> dado que GFT-M1 y GFT-M2 son capaces de generar estados excitados triplete, como GFT, se midió el rendimiento cuántico de formación de  $^1\text{O}_2$  en tolueno y en acetonitrilo, obteniéndose unos valores similares a los de GFT. Como se puede observar, los valores de  $\phi(^1\text{O}_2)$  son ligeramente inferiores en MeCN que en Tol (tabla 3.3), lo cual concuerda con la menor formación de estados triplete en acetonitrilo.

**Tabla 3.3.** Propiedades de absorción transitoria y  $^1\text{O}_2$  obtenidas por LFP de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en tolueno y acetonitrilo en atmósfera de  $\text{N}_2$  a  $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ .

	Disolvente	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\tau_{\text{T}}$ ( $\mu\text{s}$ )	$\phi(^1\text{O}_2)$
GFT	Tolueno	600	2.0	0.17
	Acetonitrilo	600	1.7	0.10
GFT-M1	Tolueno	600	1.3	0.07
	Acetonitrilo	600	1.3	0.04
GFT-M2	Tolueno	600	1.4	0.22
	Acetonitrilo	600	1.7	0.10

### 3.3. CONCLUSIONES

En este capítulo se ha investigado el comportamiento fotofísico del TKI gefitinib y el de sus principales metabolitos fotoactivos (GFT-M1 y GFT-M2) en disolventes orgánicos de distinta polaridad, haciendo uso de técnicas espectroscópicas tales como fluorescencia y absorción transitoria. Así, se han identificado y caracterizado las principales especies transitorias generadas tras la excitación de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 con radiación UV-A, las cuales se resumen en la figura 3.18, así como los principales procesos fotoinducidos que tienen lugar en escala de tiempo de fs-ps.

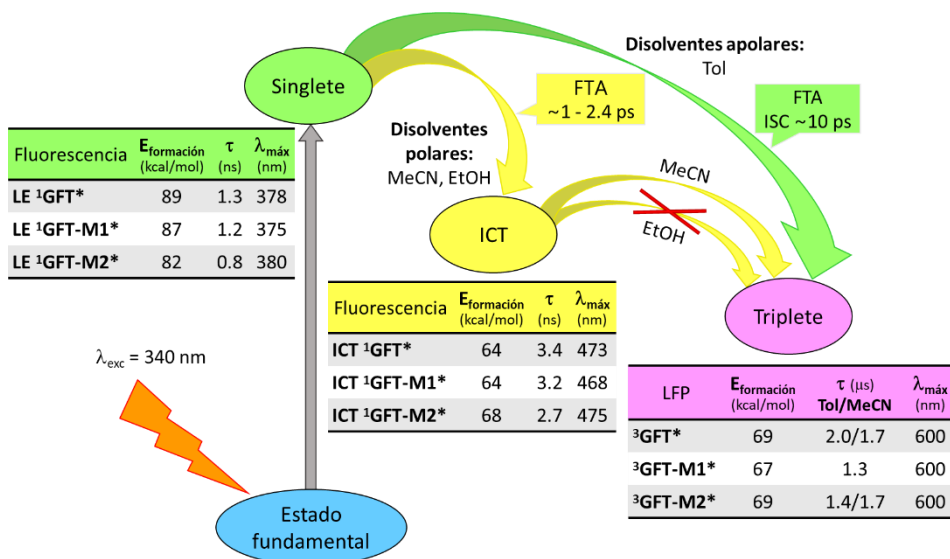


Figura 3.18. Resumen de las especies transitorias generadas y de los procesos fotoinducidos que tienen lugar en disolución orgánica tras irradiar GFT, GFT-M1 y GFT-M2 con luz UV-A.

Los estudios de FTA muestran que la excitación del fármaco y de GFT-M1 da lugar a la formación instantánea de estados LE ( $\lambda_{máx} \sim 480 \text{ nm}$ ) tanto

en medio polar como apolar. En disolventes apolares como tolueno estas especies son capaces de formar estados excitados triplete por ISC; en el caso de  $^3\text{GFT}^*$  ( $\lambda_{\text{máx}} \sim 600 \text{ nm}$ ), este proceso tiene lugar en unos 10 ps. Sin embargo, en disolventes apolares los estados LE evolucionan para formar estados ICT ( $\lambda_{\text{máx}} \sim 435 \text{ nm}$ ), que son los precursores directos de los estados excitados triplete, la formación de los ICT ocurre en tiempos de *ca.* 1 ps para GFT y de *ca.* 2.4 ps para GFT-M1. Estas especies también se detectaron por espectroscopía de fluorescencia. Así pues, los estados LE emiten a longitudes de onda de  $\sim 380 \text{ nm}$  con rendimientos cuánticos de fluorescencia de *ca.* 0.19 y tiempos de vida en el rango de 0.8-1.3 ns. Por el contrario, los estados ICT emiten a longitudes de onda mayores ( $\sim 470 \text{ nm}$ ) con rendimientos más bajos ( $\phi_{\text{F}} \sim 0.05$ ) y  $\tau_{\text{F}}$  mayores ( $\sim 2.7\text{-}3.4 \text{ ns}$ ).

Los estados excitados triplete, principalmente para  $^3\text{GFT}^*$ , se caracterizaron haciendo uso de LFP, donde se ha observado desactivación por oxígeno molecular, así como formación de estados triplete por fotosensibilización. Sorprendentemente, no se ha detectado formación de  $^3\text{GFT}^*$  en etanol por irradiación directa del fármaco, ya que la energía de los estados ICT (65 kcal/mol) es menor que la de  $^3\text{GFT}^*$  (69 kcal/mol), por lo que el proceso no es termodinámicamente favorable. Sin embargo, sí se ha detectado la formación de  $^3\text{GFT}^*$  en etanol utilizando MAP como fotosensibilizador.

Por último, se ha observado la formación de la especie oxidante  $^1\text{O}_2$  a partir de los estados excitados triplete tanto del fármaco como de los metabolitos en distintos disolventes, tolueno y acetonitrilo, obteniendo rendimientos cuánticos ligeramente inferiores en MeCN. Esto se debe

principalmente a que los rendimientos cuánticos de los precursores, es decir, los estados excitados triplete, son ligeramente inferiores en acetonitrilo.

En vista del potencial fotosensibilizante mostrado por el fármaco y los metabolitos en medio orgánico, conviene estudiar su comportamiento fotofísico en medio biológico, especialmente en presencia de proteínas. Así pues, el siguiente capítulo se centrará en caracterizar las propiedades fotofísicas de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en medio biológico, concretamente en presencia de proteínas transportadoras que se encuentran en el torrente sanguíneo, como son la albúmina sérica humana y la  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida. Así pues, se identificarán y caracterizarán las especies transitorias generadas tras la irradiación de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en medio biológico con irradiación UV-A. De esta forma, se pretende entender con mayor detalle el mecanismo por el cual tanto el fármaco como los metabolitos generan daño fotoinducido a biomoléculas.

### 3.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

#### 3.4.1. Materiales

Gefitinib (CAS 184475-35-2) fue adquirido de Quimigen. El metabolito *O*-desmorfolinopropil gefitinib (GFT-M1) (CAS 184475-71-6) fue obtenido de Fluorochem, mientras que el metabolito *O*-desmetil gefitinib (GFT-M2) (CAS 847949-49-9) se compró de Biosynth Carbosynth. Los disolventes orgánicos son de grado HPLC de Scharlab.

#### 3.4.2. Medidas espectroscópicas

Para el desarrollo de este capítulo, se han empleado varias técnicas espectroscópicas tales como la espectrofotometría de fluorescencia, la espectrofotometría de fosforescencia, la fotólisis de destello láser (LFP) y la absorción transitoria a escala de femtosegundo (FTA). Estas técnicas se explican en detalle en el Anexo I – Técnicas espectroscópicas y metodología general.

Las disoluciones de GFT y/o de sus metabolitos en los distintos disolventes orgánicos se prepararon a partir de una disolución madre de GFT (o GFT-M1 y GFT-M2) 10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO), manteniendo el contenido en DMSO en la disolución final por debajo del 2 %; se ha visto que esta cantidad ayuda a solubilizar los compuestos sin alterar sus propiedades fotofísicas.

En cuanto a las condiciones experimentales, los espectros de absorción UV-vis se registraron a concentraciones de fármaco o metabolitos de 10  $\mu$ M. Esta misma concentración fue la empleada para las medidas de fluorescencia en estado estacionario y de resolución temporal a



temperatura ambiente, manteniendo la absorbancia en torno a 0.1 a la longitud de onda de excitación (340 nm). Las cinéticas de fluorescencia se realizaron utilizando un filtro de luz WG370. Las medidas de fluorescencia y fosforescencia en matriz sólida se realizaron en etanol y en ciclohexano. Para formar los cristales, se utilizaron tubos de cuarzo de 5 mm de diámetro sumergidos en una camisa de cuarzo con nitrógeno líquido (77 K). En este caso, la absorbancia de las muestras se ajustó a 0.6 a la longitud de onda de excitación de 340 nm.

Por otra parte, las medidas de absorción transitoria a escala de femtosegundo se llevaron a cabo a  $\lambda_{\text{exc}} = 330$  nm. Las disoluciones se prepararon con una absorción sobre 0.8 a 330 nm en cubetas de cuarzo de 1 mm. Los experimentos de LFP se llevaron a cabo a  $\lambda_{\text{exc}} = 355$  nm en cubetas de cuarzo de 10 mm, donde las disoluciones se prepararon con una absorbancia de *ca.* 0.2 a dicha longitud de onda.~

### 3.4.3. Experimentos de desactivación del triplete por oxígeno

Los experimentos de desactivación del estado excitado triplete del fármaco ( $^3\text{GFT}^*$ ) por oxígeno molecular se llevaron a cabo a  $\lambda_{\text{exc}} = 355$  nm en acetonitrilo, con absorbancia *ca.* 0.3. Para calcular la constante de desactivación  $k_Q$  se aplicó la ecuación de Stern-Volmer (ecuación 3.1):

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_Q \cdot \tau_0 \cdot [Q] \quad (3.1)$$

donde  $\tau$  es el tiempo de vida media de la especie desactivada en presencia de una concentración de agente desactivante (en este caso  $\text{O}_2$ ) concreta  $[Q]$ ,  $\tau_0$  es el tiempo de vida media de la especie en ausencia de  $\text{O}_2$ , y  $k_Q$  es la constante de desactivación del proceso.

Por tanto, mediante la representación del tiempo de vida media en función de distintas concentraciones de fotosensibilizador, se puede obtener el valor de la constante de desactivación a partir de la pendiente de la recta del ajuste lineal de los puntos representados.

#### 3.4.4. Experimentos de LFP en presencia de NPX y MAP

La caracterización del estado excitado triplete del fármaco  $^3\text{GFT}^*$  se corroboró por LFP mediante un experimento de fotosensibilización entre GFT, actuando como dador, y NPX, actuando como aceptor. Así, la excitación selectiva de GFT ( $E_T = 69$  kcal/mol) a 355 nm induce un proceso de transferencia de energía triplete-triplete (*triplet-triplet energy transfer*, TTET) a NPX ( $E_T = 62$  kcal/mol). En este sentido, se prepararon disoluciones de GFT 100  $\mu\text{M}$  en ausencia y presencia de NPX 10 mM en acetonitrilo, las cuales se sometieron a LFP a  $\lambda_{\text{exc}} = 355$  nm en atmósfera inerte de nitrógeno. De modo similar, el experimento de fotosensibilización de  $^3\text{GFT}^*$  en etanol se llevó a cabo empleado 2'-metoxiacetofenona (MAP) como fotosensibilizador,<sup>12</sup> siendo en este caso GFT el aceptor en el proceso de TTET.

#### 3.4.5. Medidas de oxígeno singlete

La detección de oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) se realizó usando el equipo LFP, midiendo las cinéticas de desaparición de la emisión cercana al infrarrojo (*near infrared emission*, NIR) a 1270 nm, correspondiente a la emisión de  $^1\text{O}_2$ , tras excitar GFT, GFT-M1 y GFT-M2 a 355 nm con absorbancias de 0.6 a dicha longitud de onda. El rendimiento cuántico de formación de  $^1\text{O}_2$  se estimó utilizando el fármaco ketoprofeno como referencia.<sup>14</sup> Las medidas se realizaron en acetonitrilo y tolueno en condiciones aeróbicas.

### 3.5 REFERENCIAS

- (1) Rawluk, J.; Waller, C. F. Gefitinib. *Recent Results in Cancer* **2018**; Vol. *211*, 235-246.
- (2) Cohen, M. H.; Williams, G. A.; Sridhara, R.; Chen, G.; Pazdur, R. FDA Drug Approval Summary: Gefitinib (ZD1839) (Iressa®) Tablets. *Oncologist*, **2003**, *8*, 303-306.
- (3) Arora, A.; Scholar, E. M. Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315* (3), 971-979.
- (4) Araki, T.; Yashima, H.; Shimizu, K.; Aomori, T.; Hashita, T.; Kaira, K.; Nakamura, T.; Yamamoto, K. Review of the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer with Gefitinib. *Clin. Med. Insights Oncol.* **2012**, *6*, 407-421.
- (5) Cersosimo, R. J. Gefitinib: An Adverse Effects Profile. *Expert. Opin. Drug. Saf.* **2006**, *5* (3), 469-479.
- (6) Selvam, T. P.; Kumar, P. V. Quinazoline Marketed Drugs-A Review. *Research in Pharmacy* **2011**, *1* (1), 1-21.
- (7) El Ouardi, M.; Tamarit, L.; Vayá, I.; Miranda, M. A.; Andreu, I. Cellular Photo(Geno)Toxicity of Gefitinib after Biotransformation. *Front. Pharmacol.* **2023**, *14*.
- (8) Vayá, I.; Andreu, I.; Lence, E.; González-Bello, C.; Consuelo Cuquerella, M.; Navarrete-Miguel, M.; Roca-Sanjuán, D.; Miranda, M. A. Characterization of Locally Excited and Charge-Transfer States of the Anticancer Drug Lapatinib by Ultrafast Spectroscopy and Computational Studies. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26* (68), 15922-15930.

- (9) Martínez, L. J.; Scaiano, J. C. Characterization of the Transient Intermediates Generated from the Photoexcitation of Nabumetone: A Comparison with Naproxen. *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68* (5), 646–651.
- (10) Chen, X.; Larsen, D. S.; Bradforth, S. E.; Van Stokkum, I. H. M. Broadband Spectral Probing Revealing Ultrafast Photochemical Branching after Ultraviolet Excitation of the Aqueous Phenolate Anion. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115* (16), 3807–3819.
- (11) Vayá, I.; Lhiaubet-Vallet, V.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. Photoactive Assemblies of Organic Compounds and Biomolecules: Drug-Protein Supramolecular Systems. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (12), 4102–4122.
- (12) Alzueta, O. R.; Cuquerella, M. C.; Miranda, M. A. Transient UV–Vis Absorption Spectroscopic Characterisation of 2' - Methoxyacetophenone as a DNA Photosensitiser. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2019**, *218*, 191–195.
- (13) Diffey, B. L.; Kochevar, I. E. *Photodermatology*, 1st edn.; Lim, H. W., Hönigsmann, H., Hawk, J. L. M., Eds.; Informa Healthcare, 2007.
- (14) De La Peña, D.; Martí, C.; Nonell, S.; Martínez, L. A.; Miranda, M. A. Time-Resolved near Infrared Studies on Singlet Oxygen Production by the Photosensitizing 2-Arylpropionic Acids. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65* (5), 828–832.







**Capítulo 4.** Comportamiento fotofísico de gefitinib y de sus metabolitos fenólicos en medio biológico

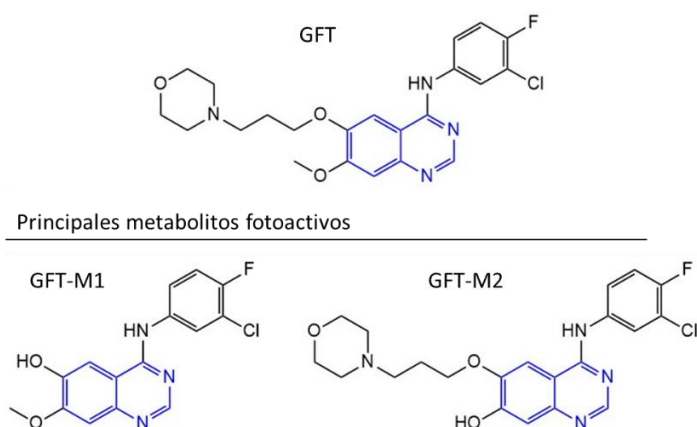






## 4.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha comentado en el capítulo anterior, la fotorreactividad de gefitinib (GFT) y de sus metabolitos fotoactivos, *O*-desmorfolinopropil gefitinib (GFT-M1) y *O*-desmetil gefitinib (GFT-M2), se ve fuertemente alterada por el microambiente en el que se encuentren, favoreciendo la formación de estados de transferencia de carga intramolecular (ICT) en medio orgánico polar y de estados localizados singlete (LE) en medio orgánico apolar. En vista de las especies transitorias generadas tras irradiar el fármaco o sus metabolitos con luz UV-A, y conociendo el daño fotobiológico que éstos provocan a biomoléculas tales como proteínas, ADN y lípidos,<sup>1</sup> conviene estudiar las propiedades fotofísicas de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 (figura 4.1) en medio biológico. En este sentido, las interacciones fármaco-proteína (o metabolito-proteína) son importantes ya que intervienen en la modulación de procesos clave tales como la farmacocinética (absorción, distribución, metabolismo y eliminación) y la farmacodinámica (efectos farmacológicos) de los fármacos, así como en la toxicidad asociada a los mismos.<sup>2</sup>



**Figura 4.1.** Estructuras químicas de GFT y sus principales metabolitos fotoactivos. En azul se resalta el cromóforo quinazolina.

La albúmina sérica humana (HSA) y la  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida (HAG) son dos de las proteínas mayoritarias en el plasma sanguíneo. Éstas se encargan, principalmente, de transportar sustancias endógenas y exógenas a través de la sangre, incluyendo fármacos, metabolitos, ácidos grasos, etc.<sup>3,4</sup> Se sabe que GFT presenta un grado de unión a HSA y HAG en plasma elevado, en torno al 97 % y 70 %, respectivamente.<sup>5</sup> Sin embargo, se desconoce el comportamiento fotoquímico de éste, así como el de sus metabolitos, en medio biológico. Por esta razón, se ha llevado a cabo un estudio completo sobre las propiedades fotofísicas de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en presencia de HSA y HAG mediante el uso de técnicas espectroscópicas tales como la fluorescencia y la absorción transitoria en escala de femtosegundo a microsegundo.

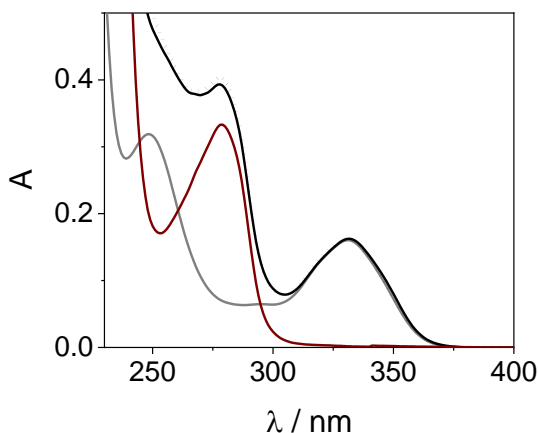
## 4.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se van a presentar inicialmente los resultados obtenidos del estudio fotofísico de los complejos GFT@HSA, para posteriormente compararlos con los formados por los metabolitos GFT-M1 y GFT-M2 con esta proteína. Por último, se mostrarán los resultados de los complejos formados por el fármaco y los metabolitos en HAG, y se hará una comparativa con los resultados obtenidos con HSA.

### 4.2.1. Caracterización fotofísica de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en HSA

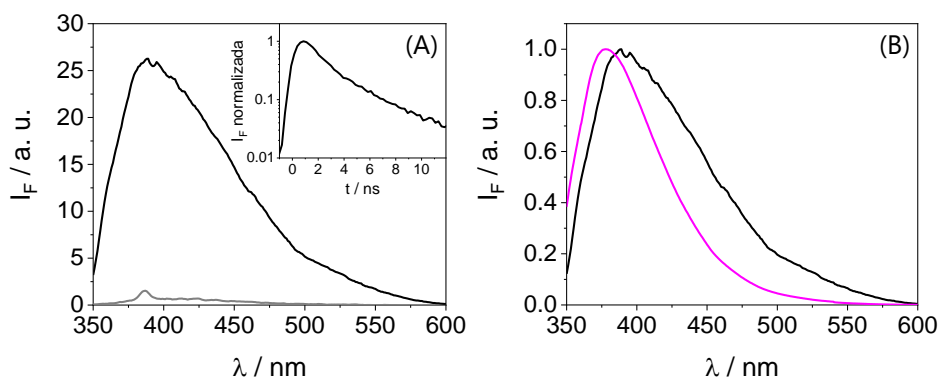
En primer lugar, se llevó a cabo el análisis Job plot<sup>6</sup> para estudiar la estequiometría de los complejos fármaco o metabolito@HSA. Para ello, se siguió el procedimiento detallado en el punto 4.4.2; como resultado se obtiene que la estequiometría del complejo corresponde con una relación molar 1:1 tanto para el fármaco como para los metabolitos en HSA. Estudios de acoplamiento molecular (*molecular docking*, MD), detallados en el siguiente capítulo, confirman dicho resultado.

En la figura 4.2 se muestran los espectros de absorción UV del fármaco libre en disolución y unido a la proteína, así como el espectro de absorción teórico de GFT unido a HSA en ausencia de interacciones desde el estado fundamental; este espectro se ha obtenido como suma de los espectros de absorción del fármaco y la proteína libres en disolución PBS. Como se puede observar, no hay diferencias significativas entre el espectro de absorción del complejo GFT@HSA experimental y teórico, por lo que se puede deducir que no existen interacciones significativas desde el estado fundamental.



**Figura 4.2.** Espectros de absorción UV para GFT (gris), HSA (rojo oscuro), GFT@HSA (negro) y GFT@HSA teórica (negro discontinuo); este espectro se ha obtenido por suma de los espectros de absorción de GFT y HSA libres en disolución, considerando que no hay interacción entre ellos desde el estado fundamental. Las medidas se realizaron a concentración 10  $\mu$ M en PBS.

La excitación selectiva de GFT unido a la proteína a 340 nm, donde HSA no absorbe (ver figura 4.2), da lugar a un aumento significativo de la fluorescencia del fármaco comparado con la observada estando libre en disolución acuosa, la cual es insignificante (ver figura 4.3). Dicho aumento de la emisión de GFT unido a HSA podría deberse a las restricciones en los grados de libertad para la relajación conformacional en el interior de la cavidad de HSA. Conviene resaltar que el perfil del espectro de emisión de GFT@HSA presenta su máximo centrado en  $\sim 390$  nm, el cual desaparece en un tiempo de unos 1.3 ns; dicho comportamiento es muy similar al detectado en ciclohexano (ver punto 3.2.1), donde se observó que la fluorescencia del fármaco presentaba un máximo  $\sim 378$  nm con  $\tau_F = 1.3$  ns. En vista de este resultado, los estados excitados formados tras la irradiación de GFT@HSA se podrían asignar tentativamente a estados LE de naturaleza singlete ( $^1\text{GFT}^*\text{@HSA}$ ).



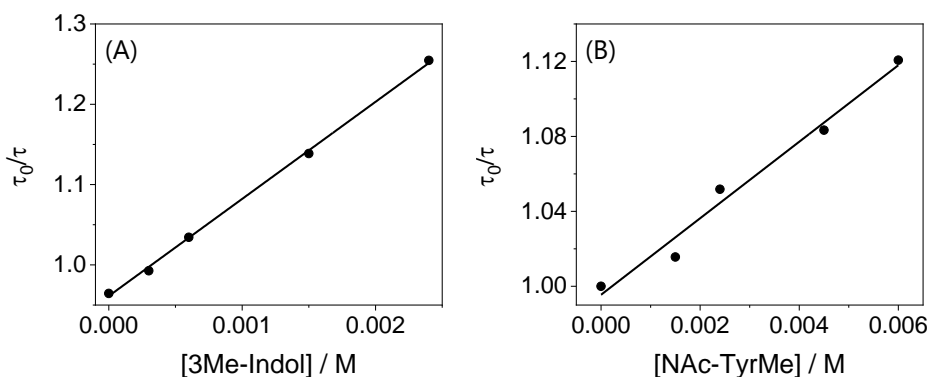
**Figura 4.3.** (A) Espectros de fluorescencia a  $\lambda_{\text{exc}} = 340$  nm de disoluciones isoabsortivas de GFT (gris) y GFT@HSA a relación molar 1:1 (negro) en PBS – insertado se encuentra el perfil cinético de fluorescencia de GFT@HSA. (B) Espectros de emisión normalizados de GFT@HSA (negro) y GFT en ciclohexano (magenta) a  $\lambda_{\text{exc}} = 340$ .

Sorprendentemente, el rendimiento cuántico de fluorescencia de GFT unido a HSA es considerablemente menor que el obtenido en ciclohexano (0.02 vs. 0.19); esta disminución podría deberse a la existencia de un proceso de transferencia electrónica (eT) a  $^1\text{GFT}^*$  desde un dador adecuado, como pueden ser los residuos de Trp y/o Tyr de la proteína.<sup>7</sup> De hecho, este tipo de procesos se ha observado previamente para otros sistemas fármaco@proteína, donde la fluorescencia se ve desactivada bien por procesos de transferencia de energía (ET), de formación de excíplejos (EXC) o eT entre el fármaco y los aminoácidos presentes en el sitio de unión de la proteína.<sup>8,9</sup> Con el fin de corroborar esta posibilidad, se ha aplicado la ecuación de Rehm-Weller para procesos de transferencia electrónica (ecuación 4.1),<sup>10</sup> considerando la energía del estado excitado singlete de GFT (82 kcal/mol, calculada en el capítulo 3), los correspondientes potenciales redox (se han utilizado los de los correspondientes cromóforos de Trp, 1-metilindol, 1.015 V, y GFT, quinazolina, -1.8 V, respectivamente) y la constante dieléctrica a temperatura ambiente del acetonitrilo (37.5).<sup>11</sup> Así pues, se obtiene un

valor de energía libre del proceso eT de -18.5 kcal/mol, por lo que se considera termodinámicamente favorable.

$$\Delta G(eT) = E_{OX} - E_{RED} - \frac{E_S}{23.061} + \frac{2.6}{\varepsilon} - 0.13 \quad (4.1)$$

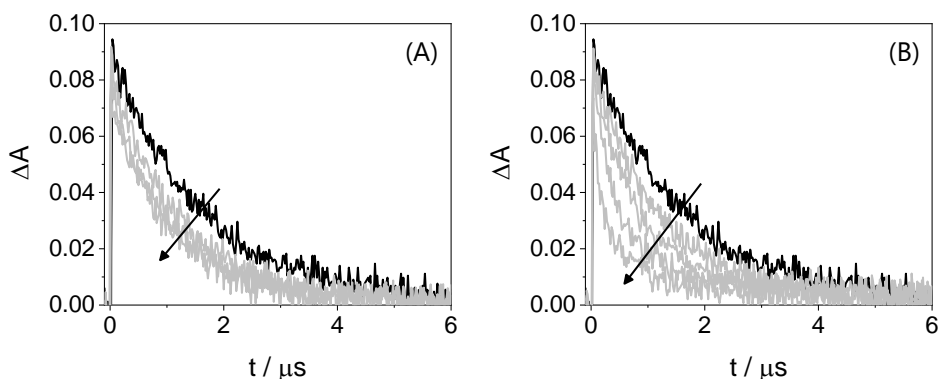
La viabilidad de este proceso se confirmó adicionalmente de manera experimental mediante medidas de fluorescencia, donde  $^1\text{GFT}^*$  se desactiva por la presencia de especies dadoras de electrones (Trp y/o Tyr). Así pues, se registraron las cinéticas de desaparición de  $^1\text{GFT}^*$  en presencia de cantidades crecientes de 3-metilindol (3Me-Indol), cromóforo del triptófano, y del éster metílico de N-acetil-tirosina (NAc-TyrMe). Tras aplicar la ecuación de Stern-Volmer (ver capítulo 3, ecuación 3.1), se obtuvieron los valores de las constantes de desactivación de  $^1\text{GFT}^*$ , siendo de  $4.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  y de  $6.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para 3Me-Indol y NAc-TyrMe, respectivamente (figura 4.4). En vista de los resultados obtenidos, el bajo rendimiento cuántico de fluorescencia de GFT unido a HSA puede explicarse por la existencia de un proceso de eT desde Trp o Tyr a LE  $^1\text{GFT}^*$ .



**Figura 4.4.** Representación Stern-Volmer para calcular el valor de la constante de desactivación de  $^1\text{GFT}^*$  en presencia de cantidades crecientes de (A) 3Me-Indol (1:15, 1:30, 1:75 y 1:120) y (B) NAc-TyrMe (1:50, 1:80, 1:150 and 1:200). Las medidas se realizaron a concentración de GFT 30  $\mu\text{M}$  en tolueno al aire, a  $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ .

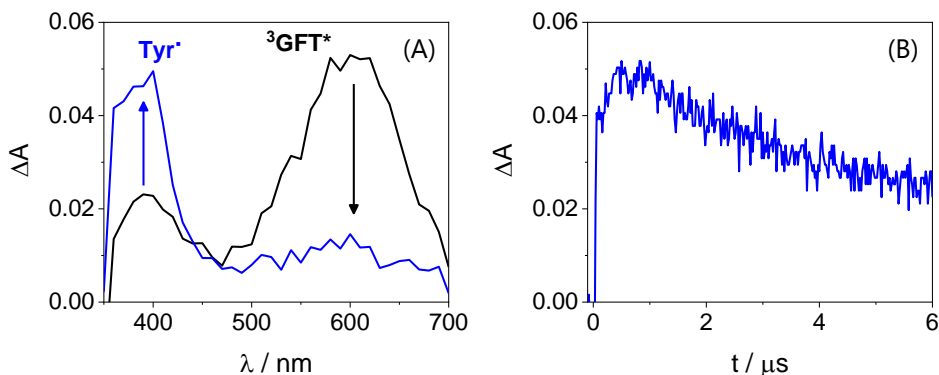
Dado que el proceso de eT podría producirse no sólo desde el estado excitado singlete del fármaco, sino también desde su estado excitado triplete ( $^3\text{GFT}^*$ ), y en vista de que  $^3\text{GFT}^*$  se puede formar tanto a partir de estados LE en disolución orgánica apolar o de estados ICT en disolución orgánica polar, se estudió la viabilidad de dicho proceso desde el estado excitado triplete del fármaco. Así pues, aplicando nuevamente la ecuación 4.1 haciendo uso de la energía de  $^3\text{GFT}^*$  ( $E_T = 69 \text{ kcal/mol}$ ) y los mismos valores de potenciales redox, se obtuvo un valor de energía libre del proceso en acetonitrilo de  $-6 \text{ kcal/mol}$  para Tyr y de  $-4 \text{ kcal/mol}$  para Trp, lo que indica que la transferencia electrónica también es termodinámicamente favorable desde el estado triplete.

De nuevo, se comprobó la viabilidad del proceso de manera experimental haciendo uso de la técnica de LFP. Para ello, se registraron las cinéticas de desaparición a  $600 \text{ nm}$ , tras excitar a  $355 \text{ nm}$  en MeCN y atmósfera inerte de  $\text{N}_2$ , de mezclas conteniendo GFT y cantidades crecientes de NAc-TyrMe o de NAc-TrpMe (ver figura 4.5). Como se puede observar, en ambos casos se produjo la desactivación de  $^3\text{GFT}^*$ , obteniéndose valores de  $k_Q$  *ca.*  $1.5 \times 10^7$  y  $1.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para Trp y Tyr, respectivamente. Cabe decir que se descartó la desactivación de  $^3\text{GFT}^*$  por un proceso de transferencia de energía a Tyr o Trp puesto que las energías de  $^3\text{Tyr}^*$  y  $^3\text{Trp}^*$  ( $82$  y  $71 \text{ kcal/mol}$ , respectivamente) son superiores a la de  $^3\text{GFT}^*$  ( $69 \text{ kcal/mol}$ ).



**Figura 4.5.** Cinéticas de desaparición a 600 nm para disoluciones de GFT (120  $\mu\text{M}$ ) en presencia de cantidades crecientes (6, 12, 18 y 24 mM) de (A) NAc-TrpMe y (B) NAc-TyrMe. Las medidas se realizaron a  $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$  en MeCN/N<sub>2</sub>.

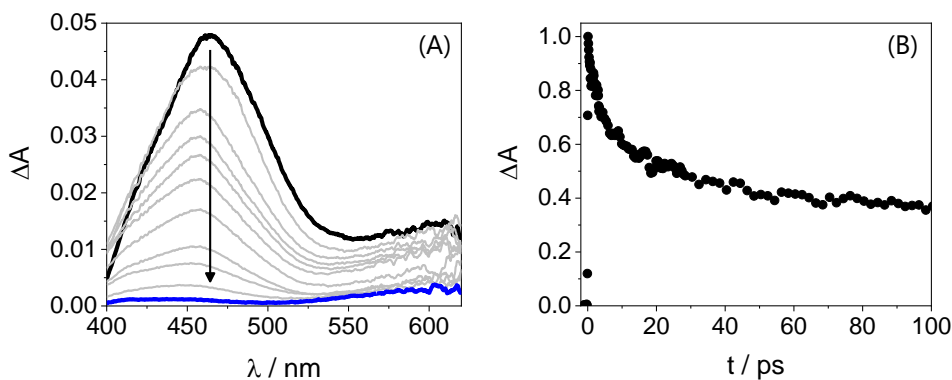
Conviene destacar que dicho proceso de eT se confirmó adicionalmente tras la detección del radical fenoxilo de la tirosina (Tyr $\cdot$ ) en mezclas GFT/NAc-TyrMe, el cual absorbe a *ca.* a 400 nm<sup>12</sup> (figura 4.6). En este sentido, los procesos de transferencia de carga fotoinducida han sido detectados previamente para otros sistemas fármaco/aminoácido.<sup>13</sup>



**Figura 4.6.** (A) Espectros de LFP registrados 0.8  $\mu\text{s}$  tras del pulso láser para GFT (negro) y una mezcla de GFT/NAc-TyrMe a relación molar 1:200 (azul) – la concentración de GFT es de 120  $\mu\text{M}$ . (B) Perfil cinético de la mezcla GFT/NAc-TyrMe 1:200 a 400 nm. Las medidas se registraron en MeCN/N<sub>2</sub> tras excitar a 355 nm.

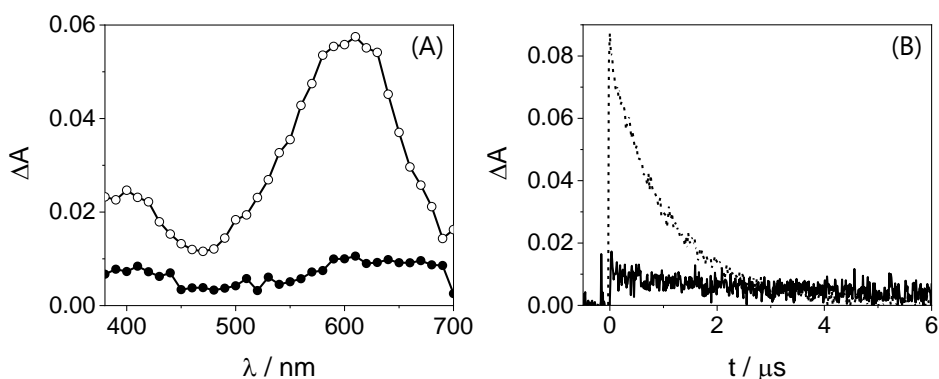


Con el fin de obtener información relevante acerca de los procesos fotoinducidos que ocurren en las etapas iniciales tras la excitación de GFT unido a HSA, se llevaron a cabo medidas de absorción transitoria a escala de femtosegundo (FTA). Así pues, la excitación de GFT@HSA a 330 nm da lugar a la formación de una única banda de absorción centrada en  $\sim 460$  nm (figura 4.7A), la cual se asigna a estados LE  $^1\text{GFT}^*$ . Esta especie desaparece siguiendo una ley multiexponencial (figura 4.7B), la cual podría asociarse a distintos procesos paralelos que se producen por las distintas conformaciones o ubicaciones de GFT en el interior de la proteína. Así, la componente más corta (*ca.* 5 ps) se relacionaría con la unión de GFT en un sitio de unión cercano a Trp o Tyr, donde el proceso de transferencia electrónica desde el aminoácido a  $^1\text{GFT}^*$  podría ocurrir con facilidad. Por el contrario, la componente más larga, la cual perdura hasta la escala de ns, podría corresponder con una localización de GFT en un sitio más alejado de Trp o Tyr, en el que la transferencia electrónica estaría impedida.



**Figura 4.7.** (A) Espectros de FTA desde 1 ps a 2 ns y (B) cinética de desaparición a 460 nm de GFT@HSA 1:1. Las medidas se realizaron a  $\lambda_{\text{exc}} = 330$  nm en PBS en condiciones aeróbicas.

Es importante decir que apenas se detectó  $^3\text{GFT}^*$  en el interior de HSA, pues la banda a  $\sim 600$  nm es residual. En este contexto, se llevaron a cabo experimentos de LFP a escala de ns para GFT@HSA tras excitar a 355 nm, los cuales muestran una absorción a 600 nm inapreciable en comparación con la obtenida en MeCN (figura 4.8). Esto podría atribuirse a la desactivación previa de los estados LE  $^1\text{GFT}^*$  por eT desde Trp o Tyr, los cuales son los precursores de formar los estados triplete. Tal y como se ha mencionado anteriormente, la transferencia electrónica tiene lugar en un tiempo de *ca.* 5 ps, más rápido que el ISC ( $\sim 10$  ps), por lo que el rendimiento de formación de  $^3\text{GFT}^*$  en HSA disminuye considerablemente.



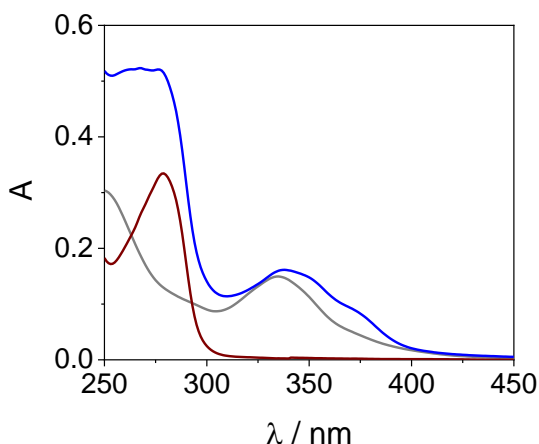
**Figura 4.8.** (A) Espectros de LFP de GFT en MeCN/N<sub>2</sub> (círculos huecos) y GFT@HSA en PBS aeróbico (círculos rellenos) tras 0.1  $\mu\text{s}$  del pulso del láser. (B) Cinéticas de desaparición de GFT en MeCN/N<sub>2</sub> (línea discontinua) y GFT@HSA en PBS aeróbico (línea continua). Las medidas se realizaron tras excitar a 355 nm disoluciones isoabsortivas a dicha longitud de onda.

Conviene recordar que el daño fotosensibilizado se puede clasificar según las especies implicadas en tipo I, cuando las especies responsables del daño a biomoléculas son especies radicalarias, o tipo II cuando la especie responsable del daño es el oxígeno singlete. Así pues, dado que la excitación selectiva de GFT en el interior de HSA no genera  $^3\text{GFT}^*$ , no

existirá interacción con el oxígeno molecular para generar oxígeno singlete, y, por tanto, el daño fotosensibilizado inducido por GFT será de tipo I.

Tras estudiar con detalle el comportamiento fotofísico de GFT unido a HSA, se va a proceder a presentar y discutir los resultados obtenidos para los metabolitos fotoactivos GFT-M1 y GFT-M2 unidos a esta proteína.

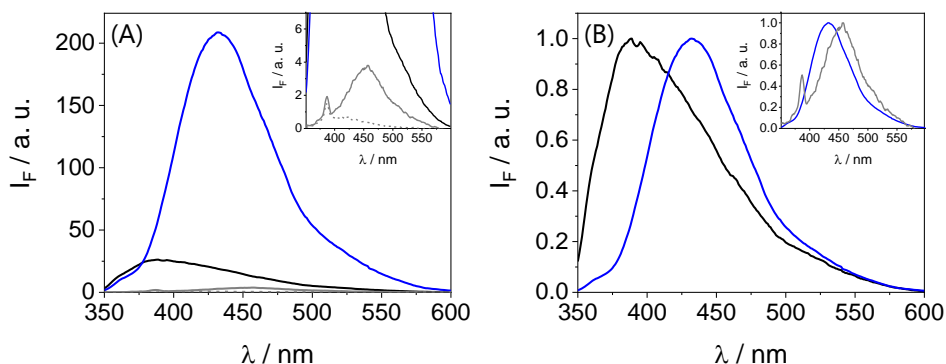
En la figura 4.9 se muestran los espectros de absorción UV de GFT-M1 y GFT-M1@HSA en PBS. Se puede observar que, cuando GFT-M1 está unido a la proteína, aparece un hombro a *ca.* 375 nm.



**Figura 4.9.** Espectros de absorción UV de GFT-M1 (gris), GFT-M1@HSA 1:1 (azul) y HSA (rojo oscuro). La concentración de todas las especies es de 10  $\mu$ M en PBS.

En la figura 4.10A, se comparan los espectros de fluorescencia de GFT y de GFT-M1 libres en disolución acuosa y unidos a HSA, tras excitar a 340 nm. Al igual que ocurría con el fármaco, la emisión del metabolito libre en disolución es insignificante, mientras que aumenta considerablemente en el interior de la proteína, debido principalmente a las restricciones conformacionales. Este efecto es mucho mayor para GFT-M1@HSA, mostrando un rendimiento cuántico de fluorescencia muy superior al de

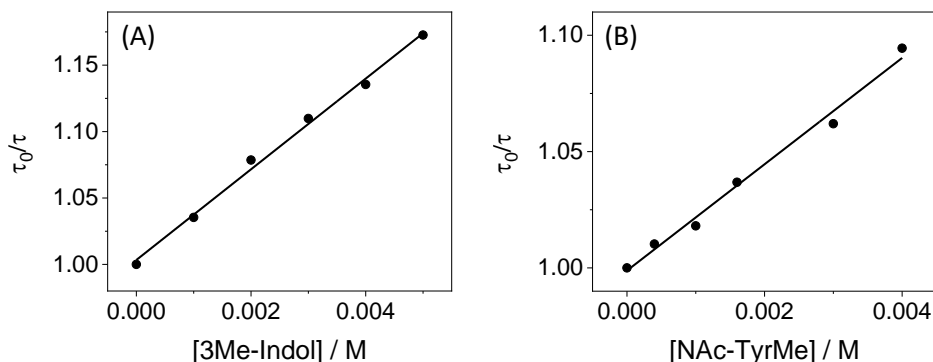
GFT@HSA ( $\sim 0.15$  vs.  $\sim 0.02$ , respectivamente). Por otro lado, también resulta interesante el desplazamiento de la emisión de GFT-M1@HSA a longitudes de onda mayores ( $\lambda_{\text{máx}} \sim 432$  nm), comparado con GFT@HSA ( $\lambda_{\text{máx}} \sim 390$  nm, ver figura 4.10B), cuya emisión proviene de los estados LE. Estos resultados indican que ocurren procesos fotoinducidos distintos para el fármaco y el metabolito en el interior de HSA tras ser irradiados.



**Figura 4.10.** (A) Espectros de fluorescencia y (B) espectros de fluorescencia normalizados para GFT (gris discontinuo), GFT-M1 (gris), GFT@HSA (negro) y GFT-M1@HSA (azul) tras excitar a 340 nm en PBS. Para las disoluciones con proteína, la relación molar es 1:1. La figura insertada en (A) muestra una ampliación de las emisiones más débiles, mientras que la figura insertada en (B) muestra los espectros normalizados de GFT-M1@HSA y GFT-M1 en PBS.

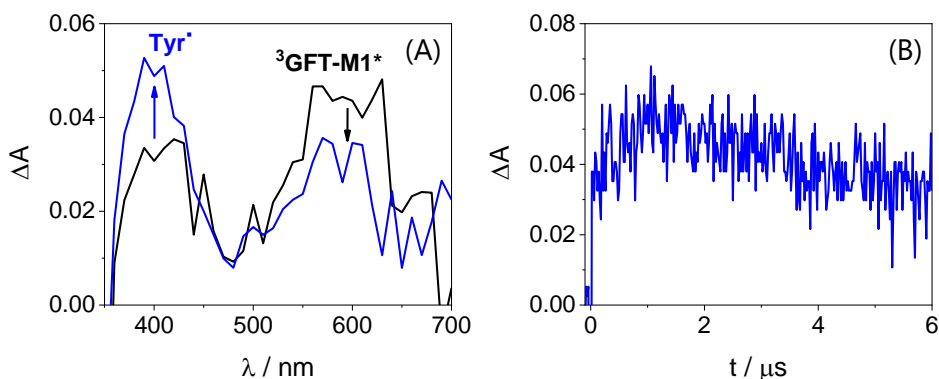
En relación al valor de  $\phi_F$  de GFT-M1@HSA, por comparación con los resultados previamente discutidos para el fármaco, también se observa que éste es menor cuando GFT-M1 está unido a HSA que cuando está en medio orgánico apolar (0.15 vs. 0.19, respectivamente). De nuevo, esta disminución en la emisión del metabolito podría deberse a un proceso de transferencia electrónica fotoinducida desde dadores adecuados (Trp/Tyr). Así pues, se realizaron experimentos de desactivación de  $^1\text{GFT-M1}^*$  en presencia de cantidades crecientes de 3Me-Indol y NAc-TyrMe, respectivamente (ver figura 4.11). En este caso, se obtuvieron valores de

constantes de desactivación de  $^1\text{GFT-M1}^*$  de *ca.*  $8.7 \times 10^9$  para 3Me-lindol y de *ca.*  $5.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para NAc-TyrMe, por lo que dicho proceso de eT también podría ser viable para el sistema GFT-M1@HSA.



**Figura 4.11.** Representación Stern-Volmer para calcular el valor de la constante de desactivación de  $^1\text{GFT-M1}^*$  en presencia de cantidades crecientes de (A) 3Me-Indol (1:50, 1:150, 1:205 y 1:250) y (B) NAc-TyrMe (1:20, 1:50, 1:80, 1:150 and 1:200). Las medidas se realizaron a concentración de GFT-M1 20  $\mu\text{M}$  en tolueno al aire, a  $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ .

Del mismo modo, este proceso también podría ocurrir desde el estado excitado triplete del metabolito ( $^3\text{GFT-M1}^*$ ) tras interactuar con Tyr y/o Trp. Se han determinado los valores de las constantes de desactivación en presencia de cantidades crecientes de NAc-TyrMe y NAc-TrpMe, obteniéndose valores de  $6.0 \times 10^7$  y  $2.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , respectivamente. Como ya se observó para el caso del fármaco, también se detectó la formación de Tyr $\cdot$  ( $\lambda_{\text{máx}} \sim 400 \text{ nm}$ ) en disolución (ver figura 4.12) como resultado de la transferencia de electrón fotoinducida.



**Figura 4.12.** (A) Espectros de LFP registrados 0.8  $\mu$ s tras del pulso láser para GFT-M1 (negro) y una mezcla de GFT-M1/NAC-TyrMe a relación molar 1:200 (azul) – la concentración de GFT-M1 es de 120  $\mu$ M. (B) Perfil cinético de la mezcla de GFT-M1/NAC-TyrMe 1:200 a 400 nm. Las medidas se registraron en MeCN/N<sub>2</sub> a  $\lambda_{\text{exc}}$  = 355 nm.

El segundo punto importante a comentar respecto al espectro de fluorescencia de GFT-M1@HSA es el máximo de emisión, el cual, respecto al del fármaco unido a la proteína, está desplazado a longitudes de onda mayores, lo cual es un indicativo de que las especies excitadas el interior de la proteína son distintas para GFT y para su metabolito. Dado que GFT-M1 es un fenol, y aunque acabamos de ver que la transferencia electrónica podría darse en el interior de la proteína, otros procesos fotoinducidos como es la transferencia de protón (*excited state proton transfer*, ESPT), que daría lugar a la formación de especies tipo fenolato en el estado excitado, podrían ocurrir de forma paralela. En este sentido, las especies tipo fenolato son conocidas por emitir a longitudes de onda más largas que su correspondiente fenol.<sup>14–16</sup>

En el caso de GFT-M1@HSA, la posible formación de especies tipo fenolato no sólo se observa por la emisión en longitudes de onda más largas, sino que también se detecta en los espectros de absorción UV por la aparición de un hombro desplazado a  $\sim$  375 (ver figura 4.9). Así, el

espectro de absorción UV de GFT@HSA apenas varía en disoluciones acuosas con pH por encima de 6, mientras que GFT-M1@HSA presenta un desplazamiento progresivo del máximo de absorción hacia longitudes de onda más largas conforme aumenta el pH (figura 4.13).

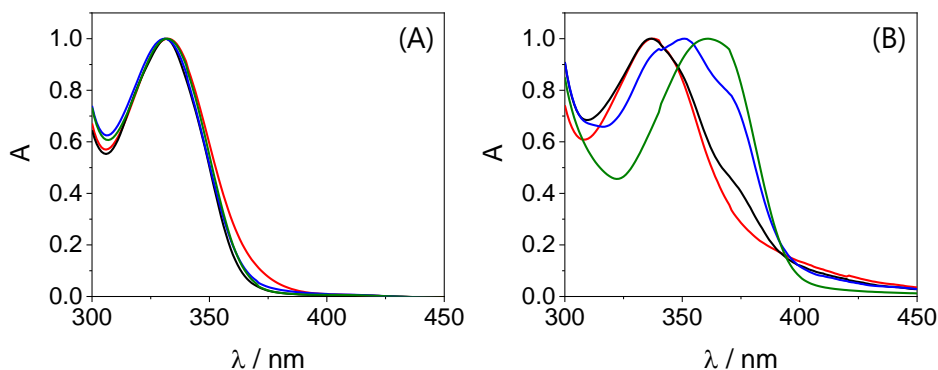


Figura 4.13. Espectros de absorción UV a pH 6 (rojo), 7.5 (negro), 8 (azul) y 10 (verde) de (A) GFT@HSA y (B) GFT-M1@HSA (relación molar 1:1 a 10  $\mu$ M).

Este efecto también se observa a distintas relaciones molares ligando@HSA (ver figura 4.14).

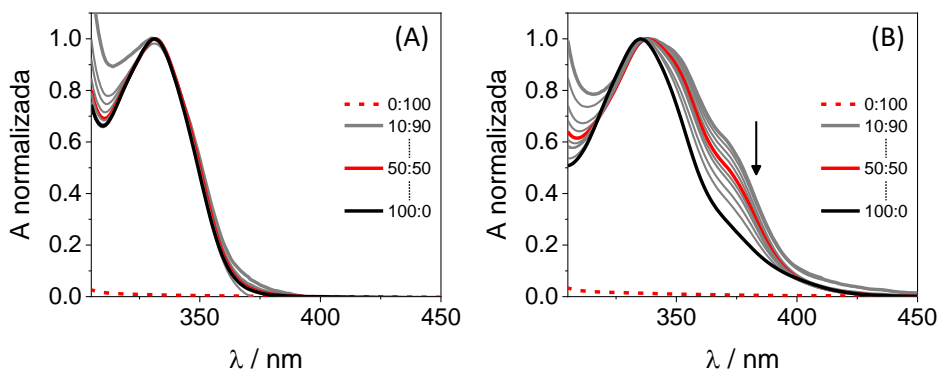


Figura 4.14. Espectros UV normalizados en el máximo de absorción para mezclas (A) GFT/HSA y (B) GFT-M1/HSA en PBS a pH fisiológico variando la ratio desde 0:100 hasta 100:0 en intervalos de 10 en 10.

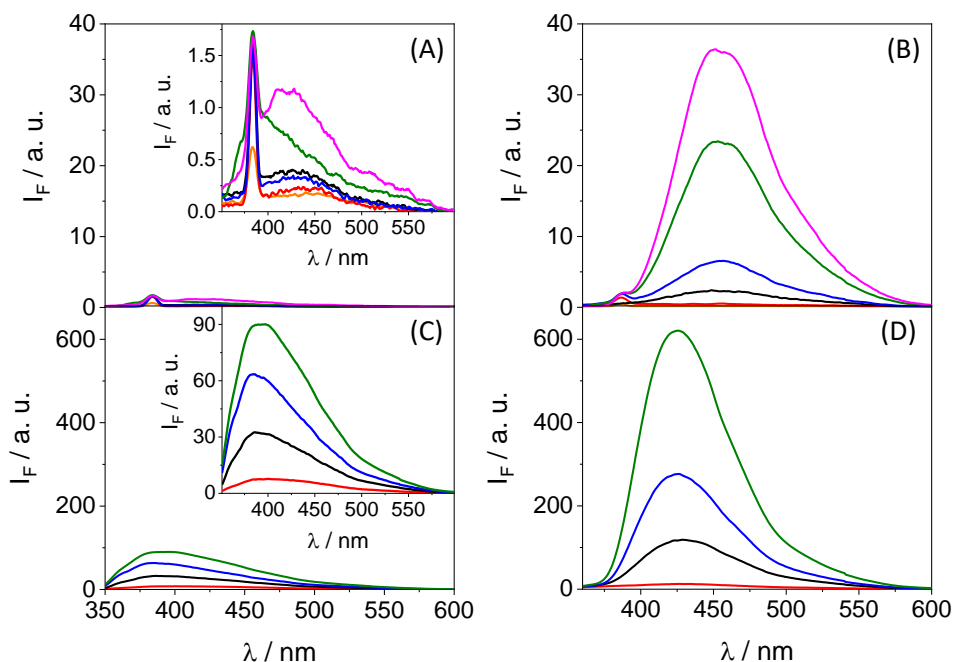
Así, mientras que los espectros de absorción de GFT@HSA no varían respecto a la cantidad de proteína del medio, sí lo hace la absorción de

GFT-M1 unido a HSA, observándose mayor cantidad de especie fenolato a relaciones mayores de HSA.

Este mismo efecto también se observa en los espectros de fluorescencia. Así, la emisión de GFT en el seno de la disolución no se ve afectada significativamente con las variaciones de pH, mientras que ésta aumenta ligeramente en el interior de HSA en disoluciones acuosas a pH desde 6 hasta 10 (ver figuras 4.15A y 4.15C). Esto se debe probablemente al equilibrio de protonación-desprotonación del nitrógeno de la morfolina, cuyo  $pK_a$  es de 5.4. Por el contrario, la emisión de GFT-M1 se ve claramente afectada por las variaciones de pH, siendo aún mayor dicho efecto en el interior de HSA (ver figuras 4.15B y 4.15D), lo cual se relaciona con la formación de la especie fenolato, cuyo  $pK_a$  para la desprotonación del grupo fenol es de 8.2.

Las pequeñas diferencias en los máximos de fluorescencia de GFT-M1 en el seno de la disolución y en el interior de HSA puede provenir del distinto microambiente como la polaridad o la conformación espacial, pero en ambos casos esta emisión se atribuye a especies tipo fenolato.





**Figura 4.15.** Espectros de emisión tras excitar selectivamente a (A) GFT en PBS, (B) GFT-M1 en PBS, (C) GFT@HSA y (D) GFT-M1@HSA a pH 2 (rosa), 6 (rojo), 7.5 (negro), 8 (azul), 10 (verde) y 12 (naranja).

Conviene resaltar que tanto  $\phi_F$  como  $\tau_F$  de GFT-M1 en el interior de la proteína son mayores que los observados para GFT@HSA ( $\phi_F$  0.15 vs. 0.02;  $\tau_F$  2.8 vs. 0.8 ns, respectivamente), lo cual podría estar relacionado con el mayor potencial fotosensibilizado del metabolito, el cual resultó ser más fototóxico que el fármaco.<sup>1</sup>

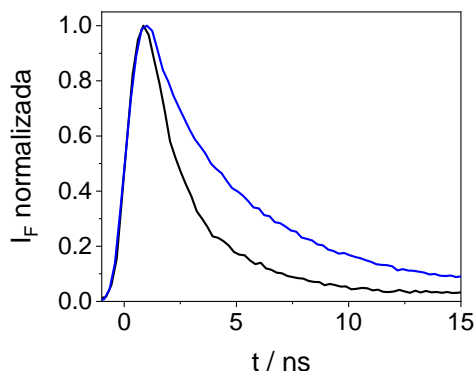
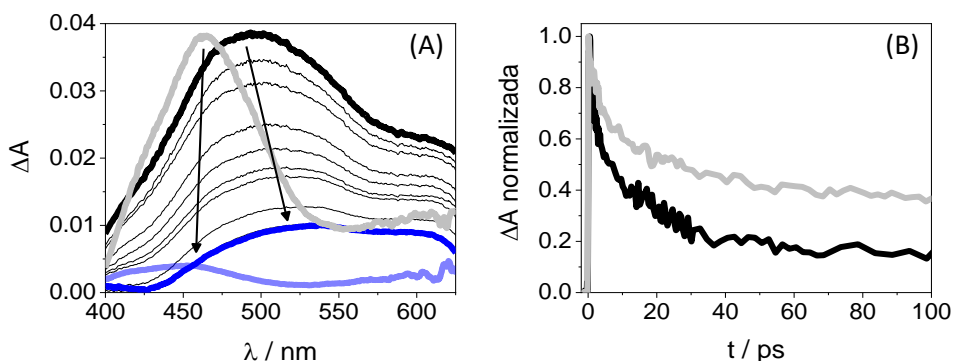


Figura 4.16. Cinéticas de fluorescencia para GFT@HSA (negro) y GFT-M1@HSA (azul) tras excitar a 340 nm en PBS.

En vista de la diferente reactividad que presentan GFT y GFT-M1 en medio proteico (eT vs. ESPT), y con el fin de estudiar con mayor profundidad los procesos ESPT propuestos para GFT-M1@HSA, se realizaron medidas de FTA a  $\lambda_{exc} = 330$  nm. En la figura 4.17A se muestran los espectros de absorción transitoria de GFT-M1@HSA desde 1 hasta 500 ps. Asimismo, se incluyen los espectros de GFT@HSA a modo comparativo, donde la banda con máximo a 460 nm se ha asignado previamente a los estados LE  $^1GFT^*$ . Por el contrario, para GFT-M1@HSA se observa la formación instantánea de una banda amplia (410-600 nm) centrada en  $\sim 500$  nm, la cual se asigna a estados LE  $^1GFT-M1^*$  de la especie fenol. Esta banda de absorción cambia su máximo hacia longitudes de onda más largas (desde 500 a *ca.* 530 nm), lo cual se puede relacionar con el proceso de transferencia de protón intermolecular desde los estados LE  $^1GFT-M1^*$  hasta un aceptor apropiado ubicado en el interior de la cavidad de la proteína para formar estados excitados de la especie fenolato. Esta asignación es coherente con los espectros de absorción ultrarrápida observados previamente para aniones fenolato.<sup>17</sup> El perfil cinético de GFT-M1@HSA se puede ajustar satisfactoriamente haciendo uso de una ley

multiexponencial, en la que la componente más corta (ps) se asigna al proceso de transferencia de protón, mientras que la componente más larga (ns) se asigna a la desaparición de los estados  $\epsilon\chi\iota\tau\alpha\delta\omicron\sigma$  del fenolato (figura 4.17B).



**Figura 4.17.** (A) Espectros de FTA desde 1 ps (negro) a 0.5 ns (azul) para GFT-M1@HSA - los espectros FTA para GFT@HSA a 1 ps (gris) y 1 ns (azul claro) se muestran como comparativa. (B) Trazas cinéticas de GFT-M1@HSA a 500 nm (negro) y de GFT@HSA a 460 nm (gris). Todas las medidas se registraron tras excitar a 330 nm los complejos ligando@proteína con relación molar 1:1 en PBS al aire.

Estos resultados concuerdan con los de absorción UV y fluorescencia en estado estacionario, en los que se observa un desplazamiento batocrómico. Es importante resaltar que prácticamente no se observó la formación de  ${}^3\text{GFT-M1}^*$  en el interior de HSA, pues su correspondiente señal de absorción transitoria *ca.* 600 nm es insignificante, incluso en escalas de tiempo superiores, haciendo uso de la técnica LFP (figura 4.18).

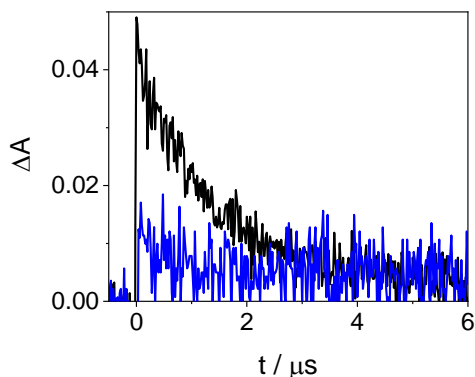


Figura 4.18. Trazas cinéticas LFP para GFT-M1 en MeCN/N<sub>2</sub> (negro) y GFT-M1@HSA en PBS al aire (azul) tras excitar a 355 nm.

Los resultados mostrados hasta ahora respecto a GFT-M1@HSA encajan con la formación de especies fenolato en el interior de la proteína, la cual impide la formación del estado triplete por cruce intersistemas. Dicha formación del fenolato se confirma adicionalmente mediante simulación de acoplamiento molecular, cuyos resultados se comentarán con más detalle en el siguiente capítulo. Así, la unión de GFT-M1 al sitio 3 de HSA permite la formación de un puente de hidrógeno entre el grupo fenol de GFT-M1 y la Val116 de la proteína (figura 4.19), el cual facilita el proceso de transferencia de protón fotoinducida.

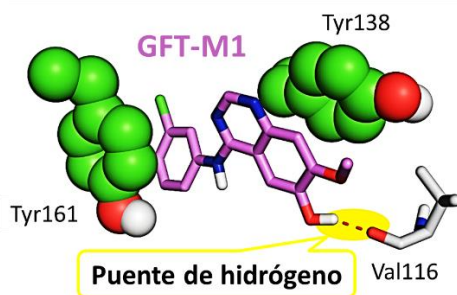
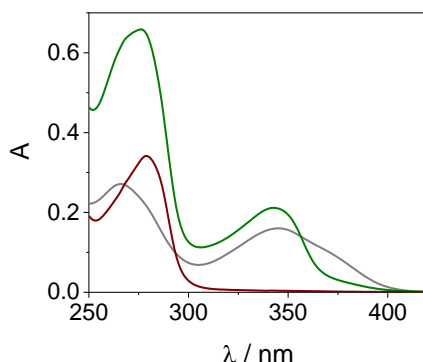


Figura 4.19. Vista detallada del modo de unión de GFT-M1 en el sitio 3 de HSA tras 90 ns de simulación.

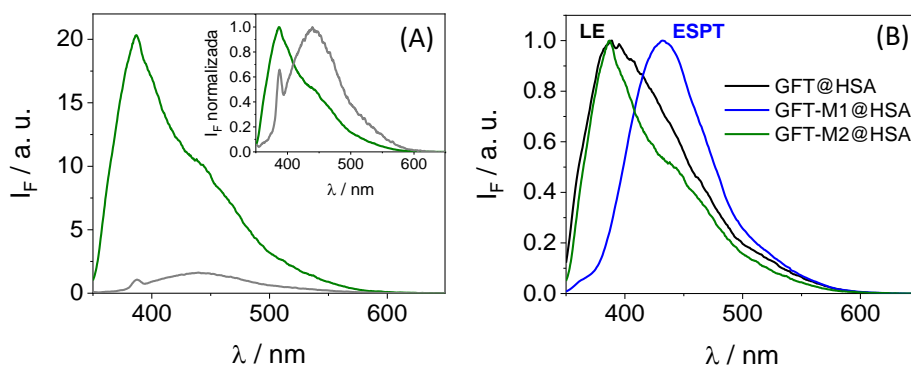
En cuanto a GFT-M2, se ha seguido el mismo procedimiento que para GFT y GFT-M1, estudiándose sus propiedades fotofísicas a  $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ , donde se irradia selectivamente al metabolito (figura 4.20).



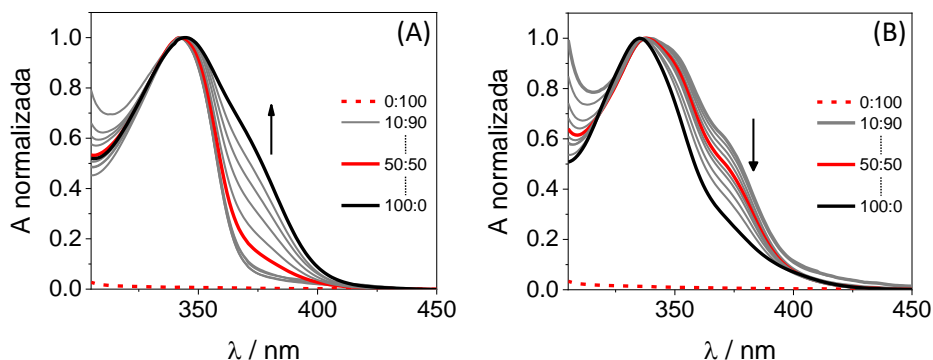
**Figura 4.20.** Espectros UV para HSA (rojo oscuro), GFT-M2 (gris) y GFT-M2@HSA a relación molar 1:1 (verde). Las medidas se realizaron a concentración  $10 \mu\text{M}$  en PBS.

Tal y como se puede observar en la figura 4.21A, la fluorescencia del metabolito aumenta considerablemente cuando se une a la proteína. Curiosamente, el perfil de emisión de GFT-M2 en el seno de la disolución de PBS es muy distinto al observado para GFT-M2@HSA; así, el máximo de fluorescencia se encuentra *ca.* 440 nm cuando está libre en disolución, mientras que este se desplaza hacia longitudes de onda más cortas ( $\sim 388 \text{ nm}$ ) cuando se une a HSA (ver figura insertada en la figura 4.21A). Dado que GFT-M2 también es un fenol, como GFT-M1, esto podría explicarse por un proceso de transferencia de protón que tiene lugar en PBS, el cual no se produce en el interior de la proteína. Este resultado concuerda con la espectroscopía de absorción UV, donde el hombro entre 370-400 nm (figura 4.20), el cual se asocia al fenolato, prácticamente desaparece en el complejo GFT-M2@HSA. Este efecto es aún más claro cuando se varía la relación molar GFT-M2/HSA, donde la formación de la especie fenolato es menor para concentraciones altas de proteína (ver figura 4.22). Esta tendencia es justamente la contraria a la observada para

GFT-M1 (ver figura 4.21B), donde la transferencia de protón es el proceso predominante en el interior de HSA, debida principalmente a las interacciones por puente de hidrógeno con Val116. En consecuencia, el espectro de emisión de GFT-M2@HSA es comparable al de GFT@HSA (figura 4.21B), por lo que cabe esperar que su emisión provenga de estados LE.



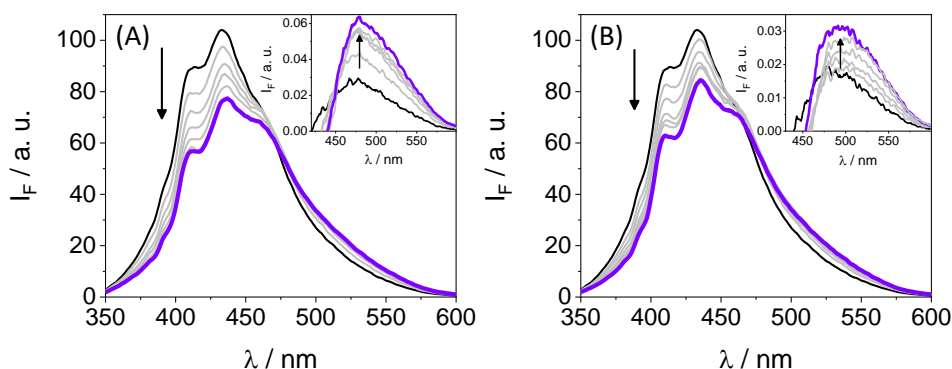
**Figura 4.21.** (A) Espectros de fluorescencia para GFT-M2 (gris) y GFT-M2@HSA (verde). La figura insertada muestra los espectros normalizados. (B) Espectros de fluorescencia normalizados para GFT-M2@HSA (verde), GFT@HSA (negro) y GFT-M1@HSA (azul). Todas las medidas se realizaron a  $\lambda_{exc} = 340$  nm en PBS, con una relación molar 1:1 (10  $\mu$ M) para los complejos ligando@HSA.



**Figura 4.22.** Espectros de absorción UV normalizados para disoluciones de (A) GFT-M2/HSA y (B) GFT-M1/HSA en disolución acuosa PBS. Las relaciones molares ligando/proteína varían de 0:100 a 100:0 a intervalos de 10 en 10.

Un aspecto importante a discutir es el bajo rendimiento cuántico de fluorescencia de GFT-M2 en el interior de la proteína ( $\phi_F \sim 0.01$ ) en comparación con el obtenido en ciclohexano ( $\phi_F \sim 0.13$ ). Tal y como se ha comentado previamente para GFT@HSA, este efecto se atribuye a un proceso de transferencia electrónica desde Tyr y/o Trp, el cual es un proceso dinámico que disminuye los valores de  $\tau_F$ .

Con el fin de investigar esta posibilidad para GFT-M2, se llevaron a cabo medidas de fluorescencia en tolueno, donde principalmente se forman estados LE, en presencia de cantidades crecientes de NAc-TyrMe y NAc-TrpMe. Curiosamente, se observa la desactivación de la fluorescencia del estado excitado singlete LE de GFT-M2 ( $^1\text{GFT-M2}^*$ ) tras la adición de Tyr o Trp (figura 4.23), pero en este caso el proceso es de naturaleza estática puesto que no se observó variación en los tiempos de vida de fluorescencia.



**Figura 4.23.** Espectros de fluorescencia de GFT-M2 tras la adición de cantidades crecientes de (A) NAc-TyrMe o (B) NAc-TrpMe. Las medidas se llevaron a cabo en tolueno con relaciones molares 1:50 (negro), 1:100, 1:200, 1:250 y 1:300 (morado) tras excitar a 340 nm. La concentración de GFT-M2 se mantuvo constante en 10  $\mu\text{M}$ .

Cabe resaltar que en ambos casos se forma una nueva banda con  $\lambda_{\text{máx}} \sim 490$  nm conforme aumenta la concentración de aminoácido (ver figuras

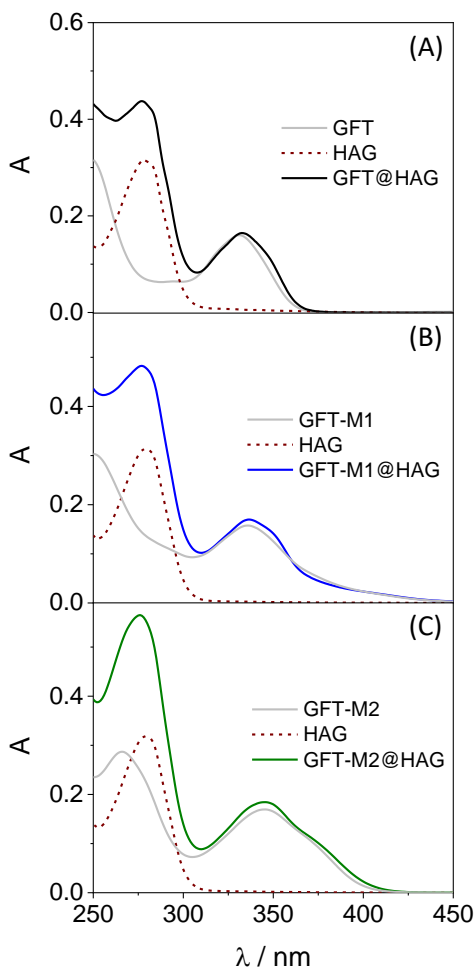
insertadas en figura 4.23), la cual se atribuye a la emisión de la especie fenolato formado desde el estado fundamental por interacciones entre GFT-M2 y Tyr (o Trp). Sin embargo, y tal como se ha comentado anteriormente, esta especie no se forma en el complejo GFT-M2@HSA, puesto que predominan los estados LE. Por tanto, podría existir una ruta de desactivación alternativa para  $^1\text{GFT-M2}^*$  en el interior de HSA, la cual tiene una gran dependencia con la orientación de GFT-M2 en el interior de HSA; estos resultados se discutirán con más detalle en el apartado de simulación de acoplamiento molecular (MD) del siguiente capítulo.

#### 4.2.2. Caracterización fotofísica de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en HAG

Una vez caracterizadas las especies transitorias generadas y los procesos fotoinducidos que se originan tras excitar selectivamente a GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en el interior de HSA, parece apropiado estudiar el comportamiento fotofísico de éstos en HAG, puesto que es otra importante proteína transportadora en el plasma humano.

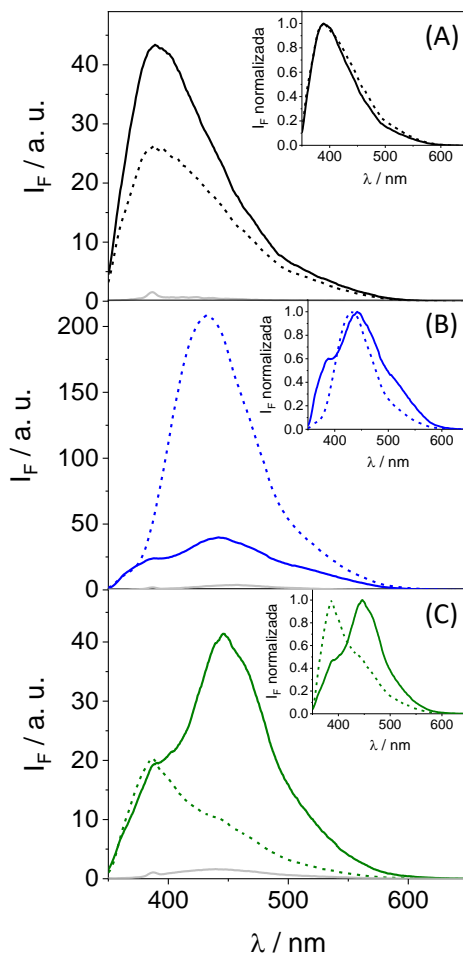
De nuevo, los experimentos de fluorescencia se llevaron a cabo a  $\lambda_{\text{exc}} = 340$  nm, donde el fármaco y los metabolitos son las únicas especies que absorben (figura 4.24). El análisis *Job plot* confirma que se forman complejos de estequiometría 1:1 entre el fármaco y/o sus metabolitos con HAG (ver punto 4.4.2).





**Figura 4.24.** Espectros de absorción para (A) GFT (gris), HAG (rojo oscuro discontinuo) y GFT@HAG (negro), (B) GFT-M1 (gris), HAG (rojo oscuro discontinuo) y GFT-M1@HAG (azul) y (C) GFT-M2 (verde), HAG (rojo oscuro discontinuo) y GFT-M2@HAG (negro). Todas las medidas se registraron a 10  $\mu$ M en PBS. Para los complejos ligando@HAG, la relación molar en disolución es 1:1.

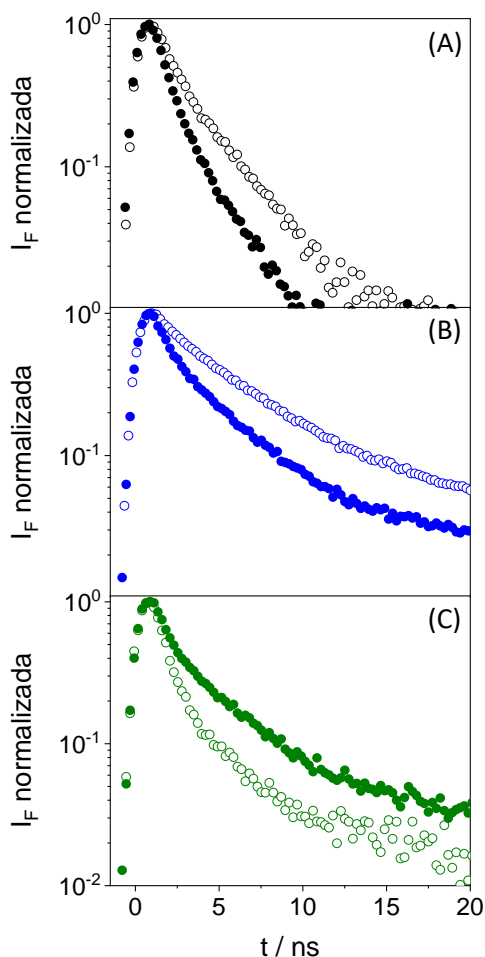
Como norma general, la fluorescencia aumenta considerablemente cuando GFT, GFT-M1 y GFT-M2 se unen a HAG (figura 4.25). Este efecto ya se observó anteriormente con HSA.



**Figura 4.25.** Espectros de fluorescencia a  $\lambda_{\text{exc}} = 340$  nm en PBS para (A) GFT (gris), GFT@HSA (negro discontinuo) y GFT@HAG (negro), (B) GFT-M1 (gris), GFT-M1@HSA (azul discontinuo) y GFT-M1@HAG (azul) y (C) GFT-M2 (gris), GFT-M2@HSA (verde discontinuo) y GFT-M2@HAG (verde). Los gráficos insertados muestran los espectros normalizados. La relación molar en los complejos ligando@proteína es 1:1 (10  $\mu$ M).

En el caso de GFT@HAG, el perfil de fluorescencia es muy similar al observado previamente en HSA (figura 4.25A), con  $\lambda_{\text{máx}} \sim 390$  nm y un ligero aumento en el rendimiento de fluorescencia en HAG. Por tanto, la emisión se asocia de nuevo a estados LE. La cinética de fluorescencia para

GFT@HAG concuerda con la emisión desde una única especie en el estado excitado, ya que se ajusta correctamente utilizando una ecuación monoexponencial (figura 4.26A). Asimismo, se han obtenido resultados similares para GFT-M1 en el interior de HSA y HAG, cuyos espectros de fluorescencia presentan su máximo *ca.* 432 y 442 nm, respectivamente (ver figura 4.25B), lo que concuerda con la emisión de especies tipo fenolato en el estado excitado, cuyo tiempo de vida media es más largo que el de los estados LE (figura 4.26B). Curiosamente, se ha detectado un hombro alrededor de 390 nm para GFT-M1@HAG, el cual se puede asociar a la emisión de estados LE, aunque en menor proporción que el fenolato. De hecho, se necesita una función biexponencial para obtener un buen ajuste de la traza cinética de GFT-M1@HAG, en la que la componente más corta ( $\sim 0.5$  ns) se asocia a la emisión desde estados LE, mientras que la componente más larga ( $\sim 3.1$  ns) se asigna al fenolato (figura 4.26B). Por el contrario, se observa un comportamiento completamente diferente para GFT-M2 en el interior de HSA y HAG. Según se ha explicado anteriormente, y tal y como se puede ver en la figura 4.25C, para GFT-M2@HSA se detecta emisión desde estados LE. Sin embargo, en HAG se observa principalmente emisión desde estados tipo fenolato, con máximos *ca.* 446 nm, y en proporción mucho menor desde estados LE, puesto que se observa un hombro *ca.* 388 nm. De nuevo, estos resultados se confirman con los resultados cinéticos (ver figura 4.26C), donde la componente larga, asignada a la especie fenolato, predomina en GFT-M2@HAG.



**Figura 4.26.** Cinéticas de fluorescencia para (A) GFT@HSA (círculos huecos negros) y GFT@HAG (círculos sólidos negros), (B) GFT-M1@HSA (círculos huecos azules) y GFT-M1@HAG (círculos sólidos azules) y (C) GFT-M2@HSA (círculos huecos verdes) y GFT-M2@HAG (círculos sólidos verdes). Las medidas se realizaron a  $\lambda_{\text{exc}} = 340$  nm a relaciones molares ligando@proteína 1:1 (10  $\mu\text{M}$ ) en PBS.

### 4.3. CONCLUSIONES

En este capítulo se han identificado y caracterizado los procesos fotoinducidos y las especies transitorias generadas tras irradiar con luz UV-A a GFT, GFT-M1 y GFT-M2 libres en disolución y unidos a las proteínas HSA y HAG en medio acuoso tamponado.

Tabla 4.1. Propiedades de fluorescencia ( $\lambda_{exc} = 340$  nm) de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en el interior de HSA y HAG.

	HSA			HAG		
	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	$\phi_F$	$\tau_F$ (ns)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	$\phi_F$	$\tau_F$ (ns)
GFT	390	0.02	1.3	390	0.03	0.8
GFT-M1	432	0.15	2.5 <sup>d</sup>	442 (390)	0.04	1.2 <sup>d</sup>
GFT-M2	388	0.01	1.0 <sup>d</sup>	446 (388)	0.03	1.4 <sup>d</sup>

Entre paréntesis se muestran los hombros detectados en los espectros de fluorescencia. El ajuste de las cinéticas se llevó a cabo utilizando una ecuación monoexponencial, excepto para <sup>d</sup>, donde el tiempo de vida media se determinó utilizando la ecuación  $\langle \tau_F \rangle = a_1\tau_1 + a_2\tau_2$ .

Los estudios de fluorescencia muestran resultados similares para GFT@HSA y GFT@HAG, que por comparativa con la emisión de GFT en ciclohexano, su irradiación con luz UV-A induce la formación de estados excitados LE <sup>1</sup>GFT\*. El máximo de fluorescencia de dichas especies se encuentra en ~ 390 nm, y presenta un tiempo de vida de *ca.* 1 ns (tabla 4.1). Sin embargo, los rendimientos cuánticos de fluorescencia son muy bajos (~ 0.02) comparados con el de ciclohexano, lo que se explica por la existencia de un proceso de transferencia electrónica fotoinducida entre <sup>1</sup>GFT\* y un dador adecuado, como Trp o Tyr del interior de la proteína. Esto se ha comprobado experimentalmente por medidas de fluorescencia en presencia de cantidades crecientes de derivados de Trp y Tyr. En línea

con estos resultados, los estudios de FTA para GFT@HSA muestran una única banda de absorción centrada en  $\sim 460$  nm, la cual se asigna a estados LE; esta especie decae siguiendo una ley multiexponencial, lo que se asocia con la desactivación de los estados LE con distintas conformaciones o localizaciones respecto a Trp y/o Tyr en el interior de HSA. Estas especies tienen un tiempo de vida de *ca.* 5 ps, lo que explica la casi inexistente formación de  $^3\text{GFT}^*$  en el interior de HSA, ya que el proceso de ISC ocurre en un tiempo de  $\sim 10$  ps. Estos resultados se han observado tanto por FTA como por LFP.

Para GFT-M1@HSA, se observa un comportamiento diferente al del fármaco. Puesto que GFT-M1 es un fenol, el proceso de transferencia de protón fotoinducida puede tener lugar en el interior de la proteína. En este sentido, los estudios de fluorescencia muestran un desplazamiento del máximo de emisión de GFT-M1@HSA a longitudes de onda mayores, *ca.* 432 nm; estas especies muestran tiempos de vida más largos ( $\sim 2.5$  ns) que los de los estados LE (ver tabla 4.1), por lo que se asignan a estados excitados tipo fenolato. Dado que los rendimientos cuánticos de fluorescencia de GFT-M1@HSA son superiores ( $\phi_F \sim 0.15$ ), podría tener implicaciones en el potencial fotosensibilizante del metabolito, el cual es el mayor de los tres derivados.<sup>1</sup> Los estudios de FTA para GFT-M1@HSA muestran la formación instantánea de una banda centrada en  $\sim 500$  nm, la cual se asigna a estados LE de tipo fenol; éstos evolucionan hacia longitudes de onda más largas, lo cual se asocia a un proceso ESPT. Este proceso se ve favorecido gracias a la formación de un puente de hidrógeno entre el fenol de GFT-M1 y la Val116 del interior de HSA, tal y como se puede observar por los estudios de simulación MD. En el caso de GFT-M1@HAG, se observa un comportamiento similar a HSA; sin embargo, se detecta un hombro en el espectro de fluorescencia *ca.* 390

nm, el cual se asigna a estados LE; de hecho, el perfil cinético de fluorescencia se ajusta a una función biexponencial, con una componente corta que se asocia a estados LE, y una componente más larga que se asigna al fenolato.

En relación a GFT-M2, se obtiene un comportamiento totalmente distinto a su homólogo GFT-M1. Mientras que GFT-M2 en el seno de la disolución y en el interior de HAG muestra un hombro *ca.* 370-400 nm en el espectro de absorción UV y un desplazamiento a longitudes de onda mayores ( ~ 446 nm) en el máximo de emisión, características que se asocian con la especie fenolato, para GFT-M2@HSA se observa emisión mayoritariamente desde estados LE  $^1\text{GFT-M2}^*$ , con un máximo de emisión ~ 388 nm.

Finalmente, la irradiación de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 no induce la formación de estados excitados triplete en el interior de las proteínas, pues los procesos fotofísicos que tienen lugar son más rápidos que el ISC. Por tanto, el daño fotosensibilizado generado por estas tres especies seguirá principalmente un mecanismo de tipo I, pues no parece viable la formación de oxígeno singlete en medio biológico.

En vista del comportamiento tan diverso observado para el fármaco y sus dos metabolitos tras interactuar con luz UV-A en medio proteico, conviene estudiar con mayor profundidad las interacciones entre estos tres derivados con HSA y HAG. Así pues, en el siguiente capítulo se van a estudiar con mayor detalle los sitios de unión donde GFT, GFT-M1 y GFT-M2 se unen a las proteínas, así como la fuerza y los tipos de interacciones que existen en el interior de HSA y HAG. Para ello, se utilizarán distintas técnicas espectroscópicas en combinación con cálculos teóricos tales como la simulación de acoplamiento molecular.

## 4.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 4.4.1. Materiales

El gefitinib se adquirió de Quimigen, el metabolito *O*-desmorfolinopropil gefitinib o GFT-M1 (CAS 184475-71-6) fue adquirido de Fluorochem y el metabolito *O*-desmetil gefitinib o GFT-M2 (CAS 847949-49-9) de Biosynth Carbosynth. Las proteínas albúmina sérica y  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida de origen humano, el éster metílico de *N*-acetil tirosina (NAc-TyrMe), el éster metílico *N*-acetil triptófano (NAc-TrpMe) y 3-metil indol (3Me-Indol) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. La disolución tampón fosfato (PBS) a pH 7.4 se preparó disolviendo 1 pastilla (Sigma-Aldrich) en 200 mL de agua ultrapura filtrada mediante un sistema Millipore (Milli-Q).

### 4.4.2. Análisis Job plot

El análisis Job plot consiste en estudiar la estequiometría de unión de un ligando a una proteína siguiendo la variación de una propiedad que depende de manera proporcional de la formación del complejo ligando@proteína, variando de forma continua la relación molar entre el ligando y la proteína, pero manteniendo la concentración molar total constante.<sup>6</sup> Así, se midieron los espectros de absorción UV de disoluciones de fármaco o metabolito en presencia de proteína variando la relación molar ligando/proteína (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100). Seguidamente, se representaron los valores de absorbancia en el máximo del ligando vs. la fracción molar ( $\chi$ ) de proteína, obteniendo como resultado que la estequiometría idónea para la formación de los complejos estudiados es de 1:1, tal y como se puede observar en las figuras 4.27 para GFT, 4.28 para GFT-M1 y 4.29 para GFT-M2.



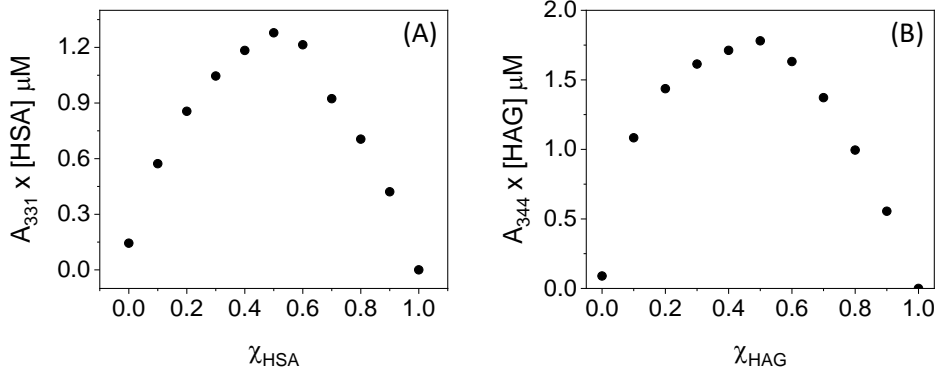


Figura 4.27. Análisis Job plot para (A) GFT@HSA y (B) GFT@HAG.

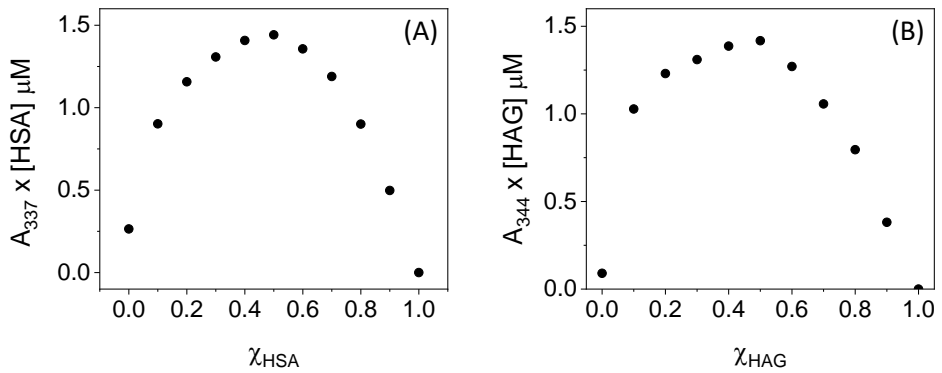


Figura 4.28. Análisis de Job plot para (A) GFT-M1@HSA y (B) GFT-M1@HAG.

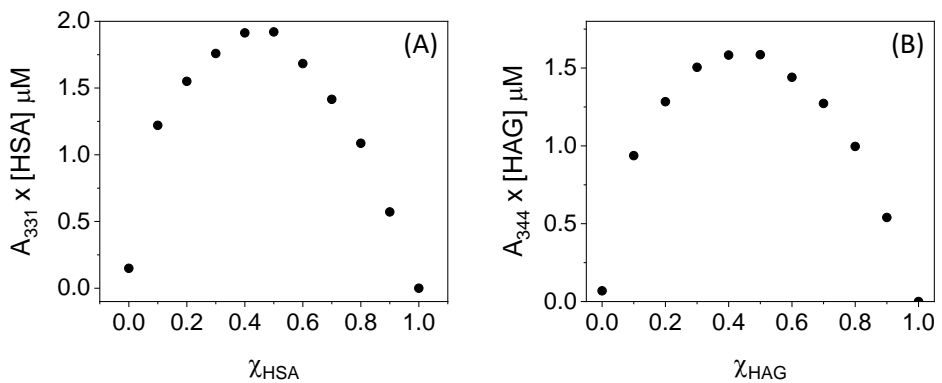


Figura 4.29. Análisis de Job plot para (A) GFT-M2@HSA y (B) GFT-M2@HAG.

#### 4.4.3. Medidas espectroscópicas

En este capítulo se han mostrado los resultados obtenidos para comportamiento fotofísico de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en disolución acuosa (PBS) y en presencia de HSA y HAG. Para realizar el estudio, se utilizaron distintas técnicas espectroscópicas tales como fluorescencia y absorción transitoria, las cuales se describen con detalle en el anexo II.

En relación a las condiciones experimentales, las disoluciones de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en PBS se prepararon a partir de una disolución concentrada (10 mM) en dimetilsulfóxido (DMSO), manteniendo la concentración de DMSO en la disolución final por debajo del 2 %; se ha comprobado que esta cantidad ayuda a solubilizar los compuestos sin alterar sus propiedades fotofísicas. Para preparar las disoluciones en proteína, se añadieron las alícuotas correspondientes para tener una relación molar entre el fármaco y/o metabolitos y la proteína de 1:1. En cuanto a la proteína, se utilizó una disolución madre de concentración 2 mM en PBS para preparar las mezclas correspondientes con fármaco o metabolito.

Los estudios de fluorescencia se llevaron a cabo con disoluciones fármacos (o metabolito)/proteína a una relación molar 1:1 tras excitar a 340 nm en atmósfera de aire a 25 °C. La absorbancia de las disoluciones se mantuvo en torno a 0.1 a la longitud de onda de excitación. En el caso de las medidas de fluorescencia en tiempo resuelto, se utilizó como fuente de irradiación una lámpara LED a 340 nm y un filtro de luz WG370 para eliminar la señal por debajo de 370 nm.

Los experimentos de fotólisis de destello láser (LFP) se llevaron a cabo excitando las muestras a 355 nm. La absorbancia a dicha longitud de onda se mantuvo por debajo de 0.2.

Los experimentos de absorción transitoria a escala de femtosegundo (FTA) se realizaron a  $\lambda_{\text{exc}} = 330$  nm en PBS y medio aeróbico. Las disoluciones se prepararon con una absorción a 330 nm *ca.* 0.8 en una celda de cuarzo de 1 mm de paso de luz.

#### 4.5. REFERENCIAS

- (1) El Ouardi, M.; Tamarit, L.; Vayá, I.; Miranda, M. A.; Andreu, I. Cellular Photo(Geno)Toxicity of Gefitinib after Biotransformation. *Front. Pharmacol.* **2023**, *14*.
- (2) Krasner, J. Drug-Protein Interaction. *Pediatr. Clin. North. Am.* **1972**, *19* (1), 51–63.
- (3) Taguchi, K.; Nishi, K.; Giam Chuang, V. T.; Maruyama, T.; Otagiri, M. Molecular Aspects of Human Alpha-1 Acid Glycoprotein — Structure and Function. In *Acute Phase Proteins*; Janciauskiene, S., Ed.; InTech, 2013.
- (4) Peters, T. Jr. in *All About Albumin*; Elsevier, Academic Press, 1995.
- (5) Li, J.; Brahmer, J.; Messersmith, W.; Hidalgo, M.; Baker, S. D. Binding of Gefitinib, an Inhibitor of Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase, to Plasma Proteins and Blood Cells: In Vitro and in Cancer Patients. *Invest. New Drugs* **2006**, *24* (4), 291–297.
- (6) Huang, C. Y. Determination of Binding Stoichiometry by the Continuous Variation Method: The Job Plot; Academic Press, 1982; Vol. 87, pp 509–525.
- (7) Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N. Further Characterization of Specific Drug Binding Sites on Human Serum Albumin. *Mol. Pharmacol.* **1976**, *12* (6), 1052–1061.
- (8) Vayá, I.; Bonancía, P.; Jiménez, M. C.; Markovitsi, D.; Gustavsson, T.; Miranda, M. A. Excited State Interactions between Flurbiprofen and

- Tryptophan in Drug-Protein Complexes and in Model Dyads. Fluorescence Studies from the Femtosecond to the Nanosecond Time Domains. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (13), 4727–4734.
- (9) Vayá, I.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. Excited-State Interactions in Flurbiprofen-Tryptophan Dyads. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (31), 9363–9371.
- (10) Weller, A. Photoinduced Electron Transfer in Solution: Exciplex and Radical Ion Pair Formation Free Enthalpies and Their Solvent Dependence. *Phys. Chem.* **1982**, *133*, 93–98.
- (11) Montalti, M.; Credi, A.; Prodi, L.; Gandolfi, M. T.; Michl, J.; Balzani, V. Handbook of Photochemistry, 3rd edition.; CRC Press, Taylor and Francis Group: Boca Raton, FL, 2006.
- (12) Lu, C.-Y.; Liu, Y.-Y. Electron Transfer Oxidation of Tryptophan and Tyrosine by Triplet States and Oxidized Radicals of Flavin Sensitizers: A Laser Flash Photolysis Study. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1571*, 71–76.
- (13) Vayá, I.; Andreu, I.; Monje, V. T.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. Mechanistic Studies on the Photoallergy Mediated by Fenofibric Acid: Photoreactivity with Serum Albumins. *Chem. Res. Toxicol.* **2016**, *29* (1), 40–46.
- (14) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, 3rd edn, 2006.
- (15) Lukeman, M.; Wan, P. A New Type of Excited-State Intramolecular Proton Transfer: Proton Transfer from Phenol OH to a Carbon Atom of

an Aromatic Ring Observed for 2-Phenylphenol. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (32), 9458–9464.

(16) Bonancía, P.; Vayá, I.; Markovitsi, D.; Gustavsson, T.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. Stereodifferentiation in the Intramolecular Singlet Excited State Quenching of Hydroxybiphenyl-Tryptophan Dyads. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (12), 1958–1963.

(17) Chen, X.; Larsen, D. S.; Bradforth, S. E.; Van Stokkum, I. H. M. Broadband Spectral Probing Revealing Ultrafast Photochemical Branching after Ultraviolet Excitation of the Aqueous Phenolate Anion. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115* (16), 3807–3819.









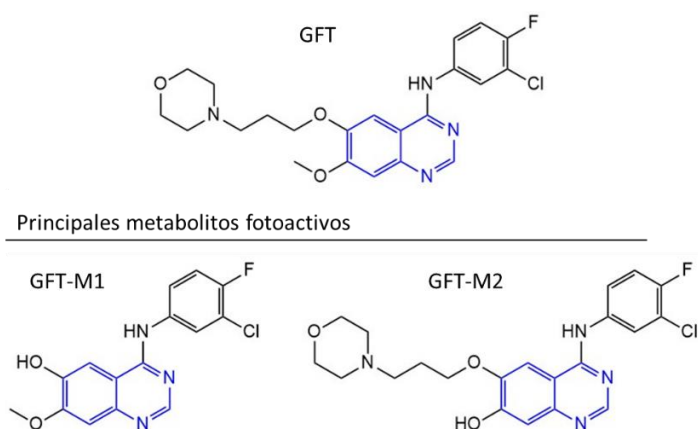
**Capítulo 5.** Interacción de gefitinib y de sus metabolitos fenólicos con proteínas transportadoras





## 5.1. INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior se ha descrito el comportamiento fotoquímico de GFT y de sus metabolitos fotoactivos GFT-M1 y GFT-M2 en medio proteico, observándose diferencias significativas en cuanto a los procesos fotoinducidos que tienen lugar en el interior de HSA y HAG, así como en las especies transitorias que se forman tras excitar los complejos fármaco o metabolito@proteína con luz UV-A. En este sentido, la fotorreactividad de estos complejos se ve fuertemente influenciada por las interacciones que se establecen con los aminoácidos presentes en el sitio de unión de las proteínas, donde la orientación del ligando en estas cavidades juega un papel importante.<sup>1-5</sup>



**Figura 5.1.** Estructuras químicas de GFT y sus principales metabolitos fotoactivos. En azul se resalta el cromóforo quinazolina.

En este capítulo se va a presentar un estudio detallado de la interacción de GFT y de sus metabolitos fenólicos (ver figura 5.1) con HSA y HAG. En concreto, se van a estudiar los sitios preferentes de unión, así como la fuerza de interacción con las proteínas y las principales interacciones con aminoácidos. Estas características son de gran importancia por estar directamente relacionadas con el transporte y el potencial

fotosensibilizante del ligando.<sup>1,6</sup> Para ello, se ha hecho uso de técnicas espectroscópicas tales como la absorción UV-vis y la fluorescencia. Ambas técnicas, principalmente la fluorescencia, tienen una alta sensibilidad y permiten determinar las constantes de unión ( $K_B$ ) ligando@proteína.<sup>7,8</sup>

Asimismo, en colaboración con la Prof. Concepción González Bello, se ha realizado un estudio teórico sobre la unión de GFT y de sus metabolitos a HSA y HAG, mediante cálculos de simulación de acoplamiento molecular (*molecular docking*, MD), con el fin de entender los resultados experimentales obtenidos en el capítulo 4. Esta metodología ha demostrado ser útil para estudiar en detalle el tipo y la fuerza de interacción ligando@proteína, así como la conformación adoptada por el ligando en el sitio de unión de éstas, los aminoácidos que intervienen en dichas interacciones y las distancias relativas entre el ligando y dichos aminoácidos.<sup>5,9,10</sup>

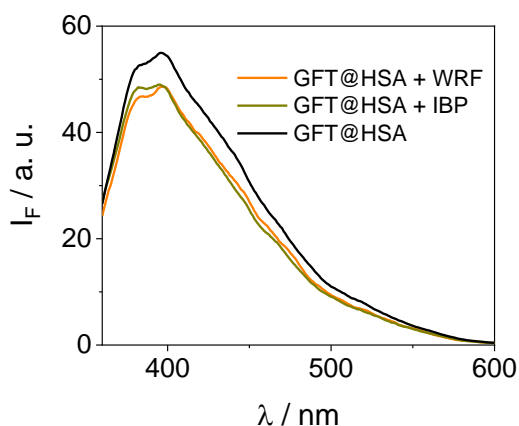
## 5.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, se van a presentar los resultados obtenidos sobre la interacción de GFT con HSA, así como las que tienen lugar con los aminoácidos del sitio de unión de la proteína. Seguidamente, se compararán dichos resultados con los obtenidos para GFT-M1 y GFT-M2 en HSA. Finalmente, se realizará un estudio similar con HAG.

### 5.2.1. Estudio de las interacciones de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en HSA

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, la albúmina sérica humana presenta tres sitios de unión preferentes denominados sitio 1, ubicado en el subdominio IIA, sitio 2, ubicado en el subdominio IIIA, y sitio 3, ubicado en el subdominio IB, muy cerca del sitio 1.<sup>1,11,12</sup> Con el fin de determinar el sitio de unión preferente de GFT en la proteína, se llevaron a cabo experimentos de fluorescencia utilizando sondas de unión selectivas a HSA. Estos experimentos permiten registrar las variaciones en el espectro de emisión del ligando@HSA, generadas tras la adición de la sonda de unión selectiva, las cuales se producen como consecuencia del desplazamiento del ligando siempre y cuando ambos compitan por el mismo sitio de unión a la proteína. En concreto, se han utilizado warfarina (WRF) e ibuprofeno (IBP) como sondas específicas de los sitios 1 y 2, respectivamente, cuyas constantes de unión son de  $\sim 1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  para WRF y de  $\sim 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  para IBP (ver punto 5.4.2).<sup>13-18</sup> Así, la adición de WRF o IBP sobre una disolución de GFT@HSA 1:1 en PBS no produce alteraciones significativas en el espectro de emisión del complejo (ver figura 5.2), lo que indica que GFT no se une preferentemente a ninguno de estos dos sitios de unión, por lo que se puede prever que lo haga al sitio 3 de HSA. Esto concuerda con resultados previamente publicados, donde se indica que GFT se une preferentemente al sitio 3.<sup>19</sup> Además,

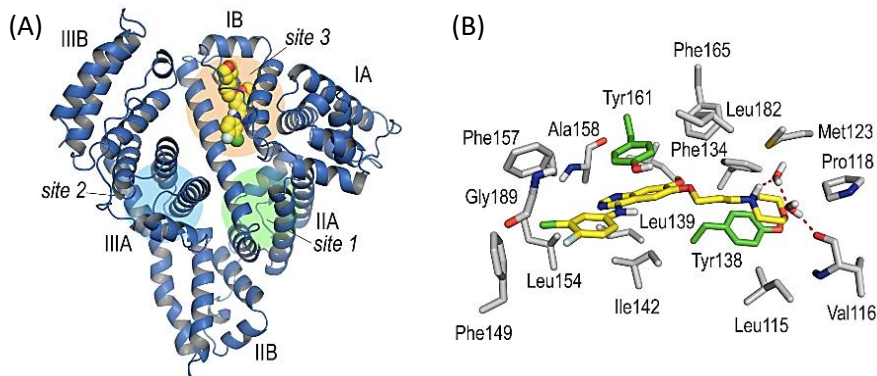
concuera con otros resultados similares obtenidos para el TKI lapatinib, donde se justifica su unión al sitio 3.<sup>5,6</sup> En este sentido, nuestros estudios teóricos de acoplamiento molecular (MD) confirman la interacción preferente de GFT en este sitio de unión (ver figura 5.3A).



**Figura 5.2.** Espectros de fluorescencia a  $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$  de GFT@HSA 1:1 (negro), GFT@HSA+WRF 1:1:1 (naranja) y GFT@HSA+IBP 1:1:1 (amarillo oscuro). Las medidas se realizaron en PBS aeróbico con concentración de GFT  $10 \mu\text{M}$ . La relación molar fármaco/sonda es 1:5.

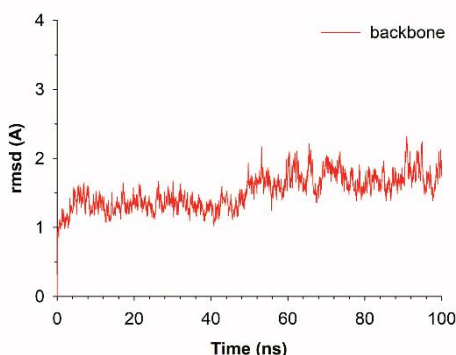
Un aspecto importante a estudiar es la fuerza de la interacción entre GFT y HSA. Existen estudios previos en los que se han publicado valores de  $K_B$  para GFT unido a HSA que varían en el rango de  $10^3 \text{ M}^{-1}$  a  $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ .<sup>19-24</sup> Puesto que estos valores difieren considerablemente entre sí, se ha calculado la constante de unión a partir de medidas espectroscópicas de fluorescencia y de absorción UV-vis aplicando un análisis de Scatchard modificado<sup>25</sup> (ver procedimiento experimental detallado en el punto 5.4.4). Así, se ha obtenido un valor medio de  $K_B \sim 7.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , con una desviación inferior al 10% entre los valores calculados mediante ambas técnicas. Este valor de  $K_B$ , además, es inferior al valor de  $K_B$  de WRF e IBP ( $\sim 1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  y  $\sim 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , respectivamente).<sup>15-18</sup>

Seguidamente, en colaboración con la Prof. Concepción González Bello y el Dr. Emilio Lence del *Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares* (CiQUS) del Departamento de Química orgánica de la Universidad de Santiago de Compostela, se han estudiado las interacciones entre GFT y los aminoácidos del interior de HSA. Los resultados confirman que la estequiometría de formación del complejo GFT@HSA es 1:1. Asimismo, la cadena flexible con el grupo morfolina de GFT determina su modo de unión a la proteína. Así, la interacción más relevante que se produce en el sitio 3 de HSA es mediante puentes de hidrógeno entre el grupo amino cuaternario de la morfolina y los residuos Val116 y Asp183 de la proteína (ver figura 5.3B), principalmente a través de una red de moléculas de agua. En este caso, no se observaron interacciones polares directas con los residuos de la proteína. Aunque la cadena con la morfolina terminal es flexible y se observa cierto movimiento en la simulación, la posición de la quinazolina se encuentra congelada en el interior de la proteína.



**Figura 5.3.** (A) Vista general del modo de unión de GFT al sitio 3 de HSA obtenida mediante simulación MD. Los subdominios y sitios de unión de HSA se encuentran etiquetados y resaltados en color verde (sitio 1), azul (sitio 2) y crema (sitio 3). (B) Vista detallada del modo de unión de GFT (amarillo) a HSA tras 100 ns de simulación. Las interacciones por puentes de hidrógeno se representan con una línea roja discontinua. Los aminoácidos más relevantes se muestran etiquetados.

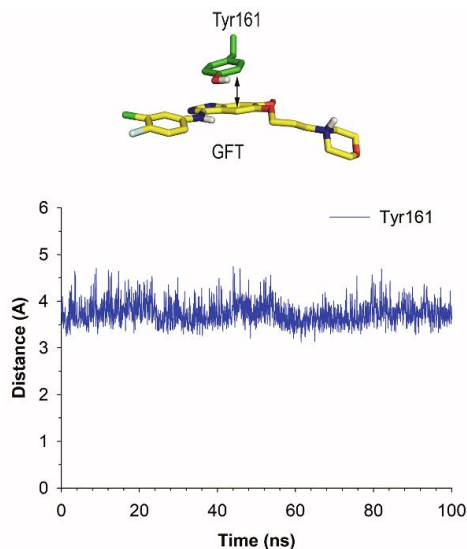
El análisis de la raíz de la desviación cuadrática media (*root-mean-square deviation, rmsd*) para el centro del cromóforo quinazolina de GFT presenta un valor medio constante de 1.9 Å durante toda la simulación (ver figura 5.4); esto se debe a la formación de un enlace  $\pi$ - $\pi$  entre la quinazolina y la cadena lateral de Tyr161 que se sitúa encima de ella.



**Figura 5.4.** Gráficas del análisis rdcn del complejo GFT@HSA con el esqueleto de la proteína calculado a partir de la simulación MD.

El análisis de la variación de las distancias relativas entre el centro de masa del grupo fenol de Tyr161 y la quinazolina de GFT en el complejo muestra distancias medias de 3.7 Å a lo largo de toda la simulación (figura 5.5). Adicionalmente, GFT se reorganiza y estabiliza en el subdominio IB mediante numerosas interacciones lipofílicas con los residuos apolares del interior de HSA, concretamente con Leu115, Pro118, Met123, Phe134, Tyr138, Leu139, Ile142, Phe149, Leu154, Phe157, Ala158, Phe165, Leu182, y Gly189.

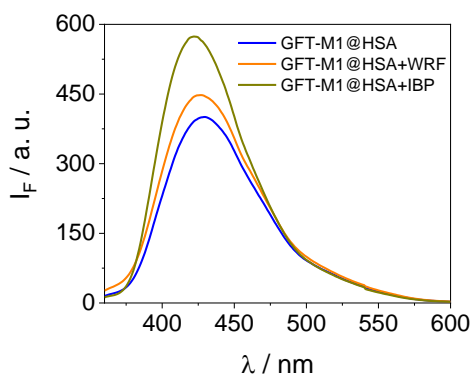




**Figura 5.5.** Evolución de la distancia relativa entre el centro de masa del grupo fenol de Tyr161 y GFT unido a HSA durante la simulación completa.

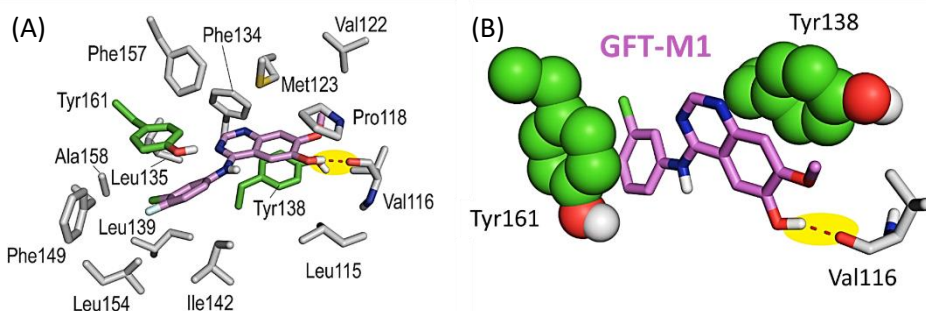
Tras conocer el modo de unión y las principales interacciones de GFT con HSA, se va a proceder a mostrar los resultados obtenidos para GFT-M1.

Primero, se estudió la unión preferente de GFT-M1 a los distintos sitios de unión de HSA mediante espectroscopía de fluorescencia, utilizando WRF e IBP como sondas de unión selectivas. De nuevo, la adición de dichas sondas apenas afectó al espectro de emisión del complejo GFT-M1@HSA (ver figura 5.6), por lo que WRF e IBP no son capaces de desplazar al metabolito de su sitio de unión; sin embargo, en ambos casos se observó un pequeño aumento de la fluorescencia, asociado a un efecto alostérico por la adición de estos. Estos resultados son consistentes con la unión preferente de GFT-M1 al sitio 3 de HSA. La constante de unión calculada mediante el análisis de Scatchard modificado (ver punto 5.4.4) da como resultado un valor de  $K_B$  *ca.*  $1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , el cual es mayor que el calculado para GFT@HSA ( $K_B(\text{GFT}) \sim 7.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ).



**Figura 5.6.** Espectros de fluorescencia para los complejos ligando@proteína (10  $\mu$ M) a  $\lambda_{\text{exc}} = 340$  nm en PBS para GFT-M1@HSA (azul), GFT-M1@HSA+WRF 1:1:5 (naranja) y GFT-M1@HSA+IBP 1:1:5 (amarillo oscuro).

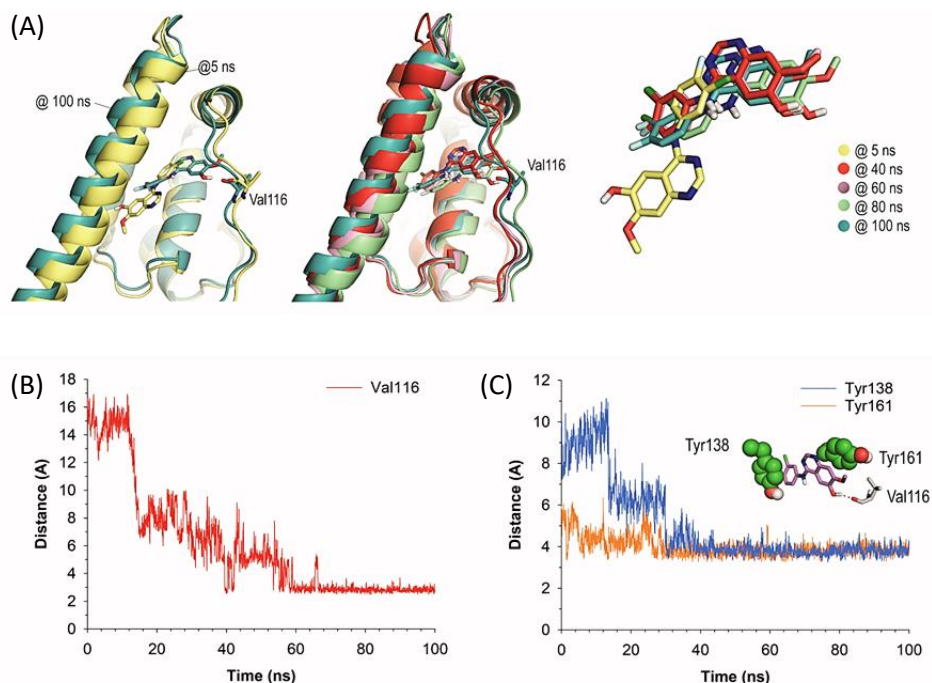
Seguidamente, se estudió el modo de unión de GFT-M1 al sitio 3 de la proteína mediante cálculos teóricos de MD. Los resultados muestran que GFT-M1 se une a dicho sitio de unión de HSA de forma claramente distinta a como lo hace el fármaco, pues la ausencia de la cadena flexible de la morfolina permite que GFT-M1 se pueda meter más en la cavidad de la proteína, estabilizando su conformación gracias a interacciones por puente de hidrógeno con Val116 e interacciones tipo  $\pi$  con dos residuos de Tyr (figura 5.7).



**Figura 5.7.** (A) Vista detallada del modo de unión de GFT-M1 (violeta) al sitio 3 de HSA tras 90 ns de simulación, donde se resalta la interacción por puente de hidrógeno entre

GFT-M1 y Val116; los residuos de aminoácido más relevantes se muestran etiquetados. Los residuos de Tyr161 y Tyr138 se resaltan en verde. (B) Detalle de las interacciones de GFT-M1 en la cavidad de la proteína: se muestra el puente de hidrógeno (línea roja discontinua) entre GFT-M1 y Val116 (sombreado en amarillo), así como las interacciones tipo  $\pi$ - $\pi$  con dos residuos tirosina (estructura verde en esferas).

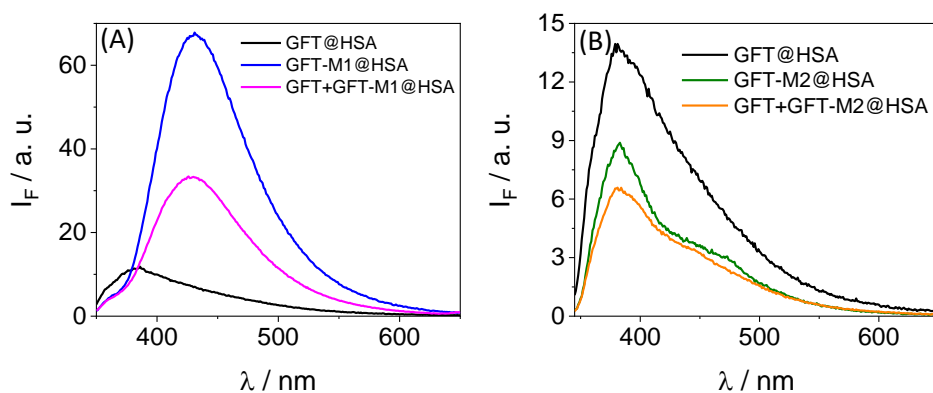
Conviene resaltar que, tras  $\sim 15$  ns de simulación, el metabolito se desplaza desde la posición inicial, con una conformación similar a la de GFT, hacia el interior de la cavidad de la proteína, orientando su grupo hidroxilo hacia el grupo carbonilo de Val116 para formar un enlace por puentes de hidrógeno, permaneciendo fijo en esta posición durante el resto de la situación (ver figura 5.8A). La distancia media de dicha interacción durante los últimos 50 ns de simulación es de 3.2 Å (ver figura 5.8B). La posición de GFT-M1 también está congelada por interacciones  $\pi$ - $\pi$  que lo fijan a los grupos fenol de Tyr 161 y Tyr 138, los cuales se ubican en ambas caras del ligando. La distancia media entre el centro de masa de los grupos fenol y la quinazolina de GFT-M1 permanece constante tras la estabilización, siendo ésta de 3.8 Å durante los últimos 50 ns de simulación (ver figura 5.8C). Al igual que ocurría con el fármaco, existen diversas interacciones lipofílicas con los residuos apolares de la cavidad de la proteína, en concreto con Leu115, Pro118, Met123, Phe134, Leu135, Ile142, Phe149, Leu154, Phe157, y Ala158.



**Figura 5.8.** (A) Comparativa de varias capturas de GFT-M1@HSA durante 100 ns de simulación MD. GFT-M1 y Val116 se representan con barras. (B) Variación relativa de la distancia entre el átomo de oxígeno (grupo OH) de la quinazolina de GFT-M1 y el átomo de oxígeno del grupo carbonilo de Val116 para el complejo GFT-M1@HSA durante la simulación completa. (C) Variación de las distancias relativas entre el centro de masa de los grupos fenol de Tyr138 y Tyr161 y GFT-M1 para el complejo GFT-M1@HSA durante la simulación completa.

A continuación, se discutirán los resultados obtenidos para la unión de GFT-M2 a HSA. En vista de los resultados mostrados anteriormente para GFT y GFT-M1, se prevé que GFT-M2 también interaccionará preferentemente en el sitio 3 de HSA, por similitud de las estructuras moleculares. La fuerza de unión se ha calculado nuevamente mediante el análisis de Scatchard modificado, obteniendo un valor de  $K_B \sim 1.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ; este valor, al igual que ocurre con GFT-M1 ( $K_B \sim 1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ), es mayor que el obtenido para el fármaco ( $K_B \sim 7.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ).

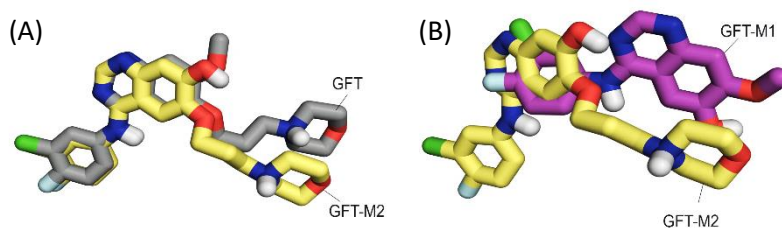
Adicionalmente, se estudió la consistencia de los valores de  $K_B$  determinados experimentalmente mediante estudios competitivos entre fármaco y sus metabolitos en HSA por espectroscopía de fluorescencia. Así, la excitación a 340 nm de disoluciones equimolares e isoabsortivas de GFT@HSA, GFT-M1@HSA y GFT+GFT-M1@HSA dio lugar a los espectros de fluorescencia mostrados en la figura 5.9A, donde se puede observar que el perfil de emisión de la mezcla GFT+GFT-M1 en presencia de proteína se asemeja más al del complejo GFT-M1@HSA, tanto en intensidad como en la posición del máximo de emisión, que a GFT@HSA. Esto concuerda con la mayor afinidad de GFT-M1 a HSA. En el caso de GFT-M2 (ver figura 5.9B), se observa un resultado similar, obteniéndose un perfil del espectro de emisión para la mezcla GFT+GFT-M2 en presencia de HSA similar al de GFT-M2@HSA, en línea con su mayor el valor de  $K_B$ .



**Figura 5.9.** Espectros de fluorescencia a  $\lambda_{exc} = 340$  nm para (A) GFT-M1@HSA 1:1 (azul), GFT@HSA 1:1 (negro) y GFT+GFT-M1@HSA 1:1:1 (puntos azules) y (B) GFT-M2@HSA 1:1 (verde), GFT@HSA 1:1 (negro) y GFT+GFT-M2@HSA 1:1:1 (puntos verdes) en PBS aeróbico.

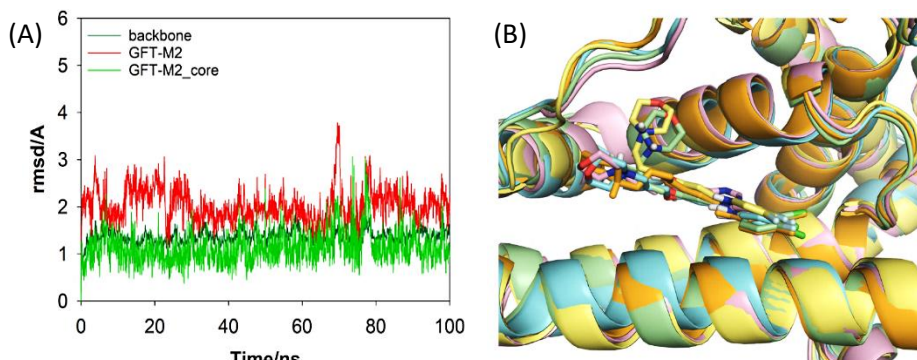
En cuanto al modo de unión de GFT-M2 a HSA, el comportamiento observado es muy distinto al de su homólogo GFT-M1, a pesar de ser un fenol como éste; mientras que GFT-M1 se introduce más en el sitio 3 de

HSA, GFT-M2 alcanza una disposición similar a la de GFT (ver figura 5.10) debido a la presencia de la cadena de morfolina.



**Figura 5.10.** Comparación del modo de unión a HSA de (A) GFT (gris) y GFT-M2 (amarillo) y (B) GFT-M1 (magenta) y GFT-M2 (amarillo); resultados obtenidos tras 90 ns de simulación MD.

Los resultados del análisis rmsd muestran que la disposición de GFT-M2 en el interior de HSA es estable durante toda la simulación (ver figura 5.11).



**Figura 5.11.** (A) Análisis rmsd para el esqueleto de la proteína (átomos  $C_{\alpha}$ , C, O y N), el ligando (átomos distintos a H) y el centro del ligando (átomos de C y N de la quinazolina) calculados mediante simulación MD para el complejo GFT-M2@HSA. (B) Captura del modo de unión de GFT-M2 en HSA a lo largo de los 100 ns de simulación (azul - 20 ns, verde claro - 40 ns, amarillo - 60 ns, rosa claro - 80 ns y naranja - 100 ns).

### 5.2.2. Estudio de las interacciones de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en HAG

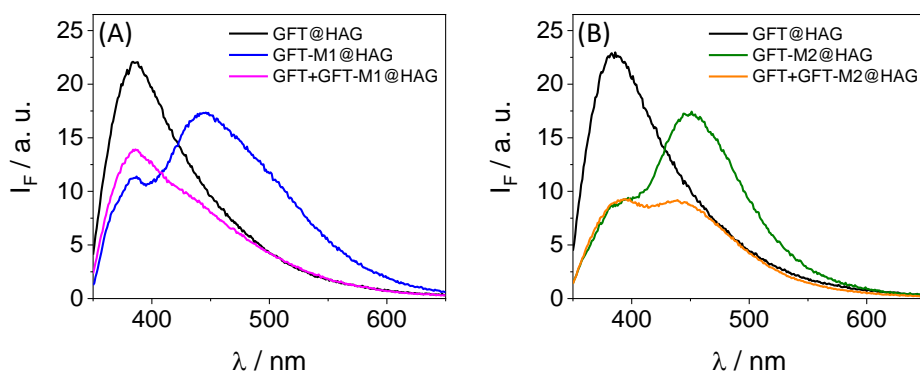
Una vez se ha estudiado con detalle el modo de unión de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 a HSA, se van a mostrar los resultados obtenidos con HAG.

Primero, se calculó la fuerza de unión del fármaco y de sus dos metabolitos a HAG aplicando el análisis de Scatchard modificado (ver punto 5.4.4). Los valores de  $K_B$ , los cuales resultaron ser del mismo orden que los obtenidos con HSA, se muestran en la tabla 5.1.

**Tabla 5.1.** Valores para las constantes de unión  $K_B$  ( $M^{-1}$ ) para GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en HSA y HAG, calculadas mediante el análisis de Scatchard modificado.

$K_B$ ( $M^{-1}$ )	GFT	GFT-M1	GFT-M2
HSA	$7.5 \times 10^4$	$1.2 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5$
HAG	$1.2 \times 10^5$	$9.4 \times 10^4$	$1.5 \times 10^5$

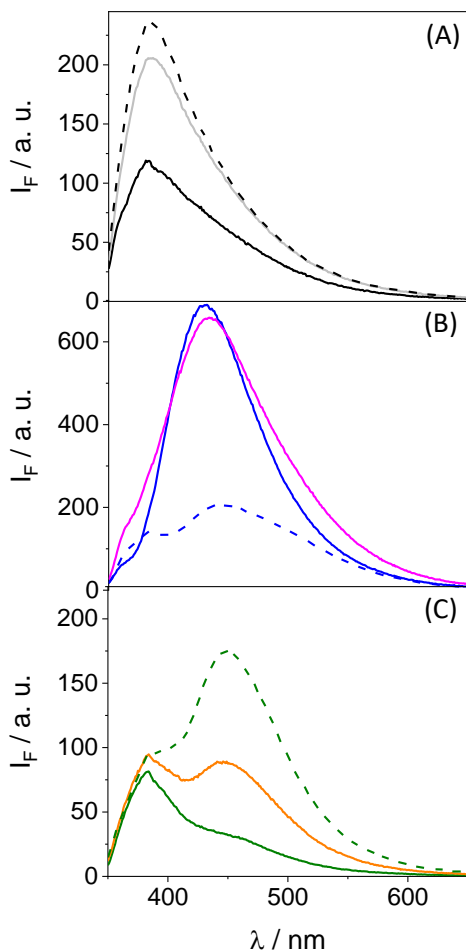
Nuevamente, se confirmó la consistencia de dichos valores por estudios competitivos entre el fármaco y sus metabolitos en dicha proteína, utilizando la espectroscopía de fluorescencia. Así pues, la emisión de una disolución conteniendo una mezcla de GFT+GFT-M1 en presencia de HAG muestra un perfil más parecido al de GFT@HAG, con un máximo *ca.* 385 nm, en concordancia con su mayor valor de  $K_B$  (ver figura 5.12A). Por el contrario, la emisión de una mezcla de GFT+GFT-M2 en presencia de HAG podría contener contribuciones equivalentes de GFT@HAG y de GFT-M2@HAG (figura 5.12B), puesto que presenta dos máximos *ca.* 390 nm y 440 nm, lo que concuerda con que los valores de  $K_B$  para GFT y GFT-M2 en HAG sean similares, tal y como se muestra en la tabla 5.1.



**Figura 5.12.** Espectros de fluorescencia a  $\lambda_{\text{exc}} = 340$  nm para (A) GFT@HAG (negro), GFT-M1@HAG (azul) y GFT+GFT-M1@HAG (rosa), y (B) GFT@HAG (negro), GFT-M2@HAG (verde) y GFT+GFT-M2@HAG (naranja). Todas las disoluciones se prepararon en PBS a relación molar 1:1 (10  $\mu\text{M}$ ) y 1:1:1 para las mezclas fármaco+metabolito@HAG.

Adicionalmente, las interacciones competitivas del fármaco (o de sus metabolitos) en una mezcla conteniendo las dos proteínas también confirma los valores de  $K_b$  mostrados en la tabla 5.1. En este contexto, la emisión de GFT en presencia de una mezcla equimolar de HSA+HAG da lugar a un perfil de emisión similar al de GFT@HAG (ver figura 5.13A), lo que concuerda con un valor de  $K_b$  más alto. De un modo similar, los espectros de fluorescencia de GFT-M1 y GFT-M2 en presencia de ambas proteínas muestran una afinidad mayor a HSA para el primero y una afinidad similar a ambas proteínas para el segundo (figura 5.13B y 5.13C, respectivamente).

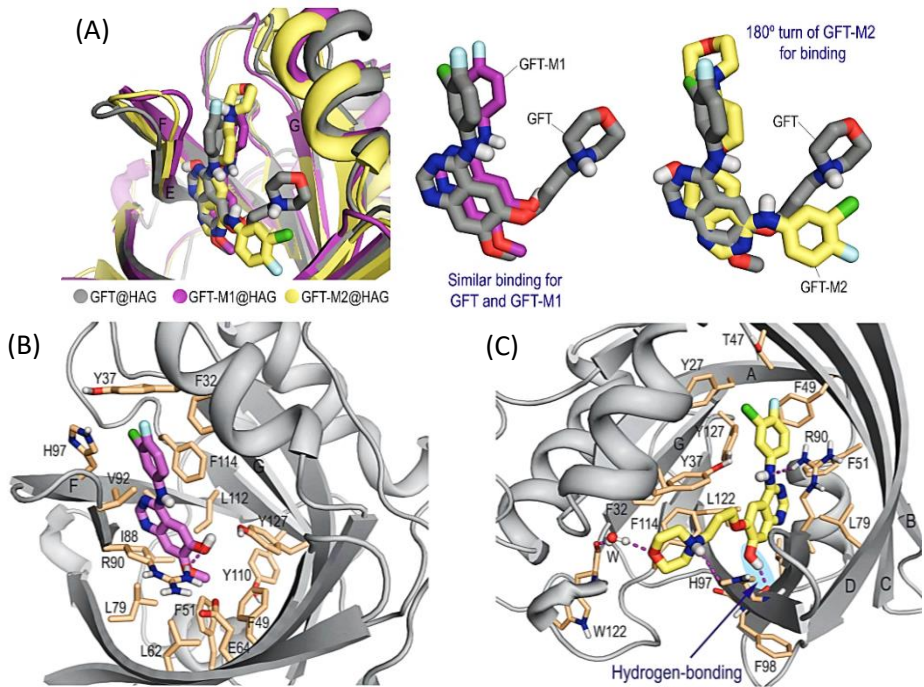




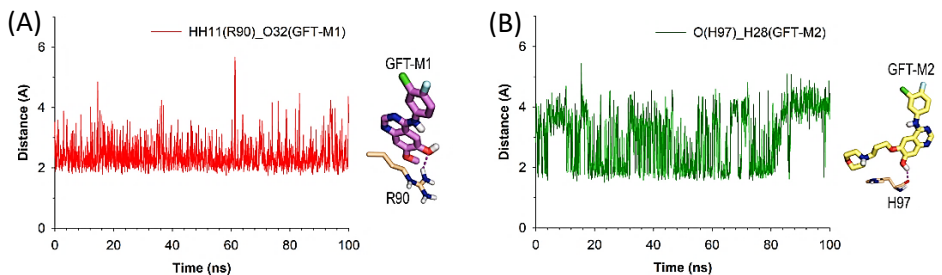
**Figura 5.13.** Espectros de fluorescencia a  $\lambda_{exc} = 340$  nm para (A) GFT@HSA (negro), GFT@HAG (negro discontinuo) y GFT@HSA+HAG (gris), (B) GFT-M1@HSA (azul), GFT-M1@HAG (azul discontinuo) y GFT-M1@HSA+HAG (rosa) y (C) GFT-M2@HSA (verde), GFT-M2@HAG (verde discontinuo) y GFT-M2@HSA+HAG (naranja). Todas las disoluciones se prepararon en PBS a relación molar 1:1 (10  $\mu$ M) y 1:1:1 para las mezclas fármaco (o metabolito)/HSA+HAG.

Para entender con mayor detalle las interacciones moleculares responsables de las diferencias observadas en el comportamiento fotofísico de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en HAG, se llevaron a cabo estudios

teóricos de simulación MD utilizando el programa GOLD (versión 20213.0). Así, los resultados del análisis rmsd indican que tanto GFT como sus metabolitos se estabilizan en el interior de la proteína. Curiosamente, la unión de GFT-M2 a HAG difiere considerablemente de la de GFT y de la de GFT-M1, los cuales se comportan de un modo bastante similar entre ellos (figura 5.14). Para GFT y GFT-M1, la pirimidina presente en el cromóforo quinazolina se posiciona cerca de las láminas  $\beta$  F y E, y la subestructura 3-cloro-4-fluorofenilo se posiciona entre las láminas  $\beta$  F y G (figura 5.14B). Además, para GFT-M1, la interacción del par electrónico solitario del oxígeno del grupo OH con el grupo guanidina de la arginina R90, con una distancia media de 2.4 Å durante los 100 ns de simulación, congela la orientación del protón fenólico hacia el seno de la disolución acuosa (ver figura 5.15A). Como consecuencia de ello, no se pueden producir interacciones de tipo puente de hidrógeno entre el protón fenólico de GFT-M1 y los aminoácidos de la proteína. Por el contrario, GFT-M2 sufre un giro de 180° para unirse a la proteína, orientando el grupo fenilo hacia las láminas  $\beta$  A y B y el grupo morfolino hacia las láminas  $\beta$  F y G (ver figura 5.14C). De este modo, el protón fenólico de GFT-M2 sí puede establecer una interacción de tipo puente de hidrógeno con el grupo carbonilo principal del residuo histidina H97, la cual es estable durante toda la simulación, con una distancia media de 2.9 Å (figura 5.15B). Adicionalmente, se observó que cuando esta interacción desaparece como resultado de la rotación del grupo OH de GFT-M2, se crea una nueva interacción similar con el grupo carbonilo del residuo fenilalanina F98.



**Figura 5.14.** (A) Captura del modo de unión de GFT (gris), GFT-M1 (magenta) y GFT-M2 (amarillo) a HAG y superposición de la disposición espacial de GFT y GFT-M1, y de GFT y GFT-M2 tras 90 ns y 80 ns de simulación MD, respectivamente. (B y C) Vista detallada del modo de unión de GFT-M1 (magenta) y GFT-M2 (amarillo) a HAG tras 80 ns de simulación – el puente de hidrógeno entre el grupo fenol y el carbonilo principal de H97 se muestra sombreado en azul.

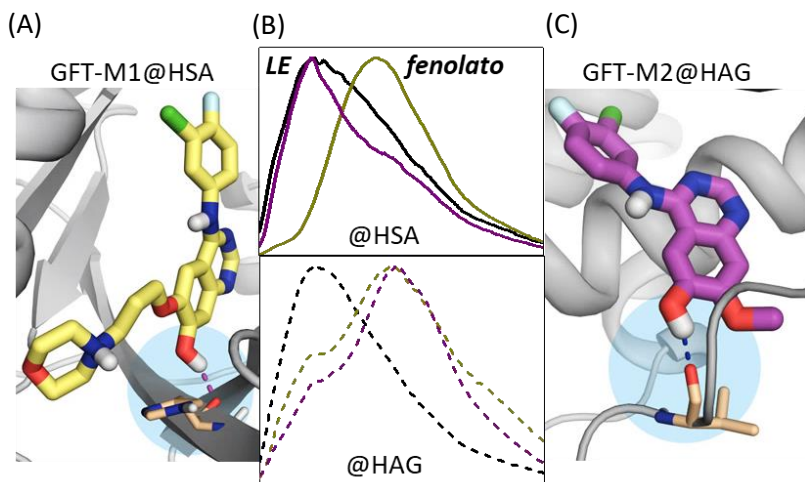


**Figura 5.15.** Análisis rmsd para (A) el grupo fenol (átomo de O) de GFT-M1 y el grupo guanidina de R90 (átomo HH11) del complejo GFT-M1@HAG y (B) el grupo fenol (átomo de H) de GFT-M2 y el grupo carbonilo principal de H97 (átomo de O) en el complejo GFT-M2@HAG, durante la simulación completa.

### 5.3. CONCLUSIONES

En este capítulo se ha estudiado la interacción de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 con HSA y HAG, así como con los aminoácidos del sitio de unión de dichas proteínas transportadoras. Para ello, se ha utilizado una combinación de técnicas espectroscópicas con cálculos teóricos y simulación de acoplamiento molecular.

En general, el comportamiento fotofísico mostrado por el fármaco y sus metabolitos depende en gran medida de la disposición espacial y la ubicación concreta que ocupan en el interior de las proteínas. Así, el modo de unión de GFT y GFT-M2 al sitio 3 de HSA es bastante similar, mientras que GFT-M1 se ubica más hacia el fondo del mismo sitio de unión debido a una interacción de tipo puente de hidrógeno entre el grupo hidroxilo y el aminoácido Val116. Esto permite la formación de especies tipo fenolato a partir de un proceso de transferencia de protón fotoinducida, como ya se ha mencionado en el capítulo anterior. Por el contrario, en HAG se obtienen resultados diferentes; en este caso, GFT y GFT-M1 se comportan de modo similar, mientras que GFT-M2 sufre un giro de 180° al unirse a la proteína el cual facilita la formación de un enlace tipo puente de hidrógeno con el aminoácido histidina H97 o, en su ausencia, con el aminoácido fenilalanina F98, lo que, de nuevo, permite la formación de especies tipo fenolato. Estos resultados están en línea con los obtenidos por medidas espectroscópicas de fluorescencia (ver resumen en la figura 5.16).



**Figura 5.16.** (A) Modo de unión de GFT-M1 (amarillo) a HSA– la interacción por puente de hidrógeno con Val116 se muestra sombreada en azul claro. (B) Espectros de fluorescencia de GFT (negro), GFT-M1 (amarillo oscuro) y GFT-M2 (morado) en HSA (línea continua) y en HAG (línea discontinua). (C) Modo de unión de GFT-M2 (morado) a HAG – la interacción por puente de hidrógeno con H97 se muestra sombreada en azul claro.

Adicionalmente, se calcularon las constantes de unión ( $K_B$ ) de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 a HSA y HAG mediante espectroscopia de absorción y de fluorescencia, obteniéndose valores relativamente parecidos, los cuales se muestran en la tabla 5.1. La consistencia de estos valores se confirmó mediante estudios competitivos en la respuesta obtenida de los espectros de emisión de mezclas conteniendo fármaco y metabolito (GFT-M1 o GFT-M2) en presencia de HSA o de HAG, así como de mezclas de HSA y HAG en presencia de GFT, GFT-M1 o GFT-M2. Finalmente, estos resultados explican con detalle el comportamiento fotofísico de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en medio proteico.

## 5.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 5.4.1. Materiales

Gefitinib (GFT) y *O*-desmetil gefitinib (GFT-M2) se adquirieron de Quimigen. *O*-desmorfolinopropil gefitinib (GFT-M1) se compró de Fluorochem. La albúmina sérica humana (HSA), la  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida de plasma humano (HAG), la warfarina (WRF) y el ibuprofeno (IBP) se adquirieron de Sigma-Aldrich. La disolución tampón fosfato (PBS) se preparó disolviendo 1 pastilla (Sigma) en 200 mL de agua ultrapura obtenida de un sistema de filtración Millipore (Milli-Q).

### 5.4.2. Experimentos de desplazamiento con sondas de unión selectivas

Uno de los métodos más utilizados para estudiar el sitio de unión preferente de un ligando a HSA consiste en el uso de sondas de unión selectiva a los sitios de unión de dicha proteína. Así, se puede utilizar la espectroscopía de fluorescencia para registrar las variaciones producidas en los espectros de emisión del ligando tras la adición de la sonda de unión selectiva. Estas modificaciones se producen como resultado de las interacciones competitivas entre el ligando y la sonda específica, produciendo el desplazamiento del ligando en el caso de que interaccione con el mismo sitio de unión con el que interacciona la sonda. En este trabajo, se ha utilizado warfarina (WRF) como sonda específica del sitio 1 ( $K_B \sim 1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) e ibuprofeno (IBP) como sonda de unión selectiva del sitio 2 ( $K_B \sim 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ).<sup>13-18</sup> El motivo de su elección reside en que ninguna de ellas absorbe luz a la longitud de onda de excitación utilizada en el experimento ( $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ ). Así, se prepararon disoluciones en PBS de GFT, GFT-M1 o GFT-M2 en presencia de HSA, a relación molar 1:1 y concentración de 10  $\mu\text{M}$ , y, posteriormente, se adicionó la sonda correspondiente a relación molar ligando/sonda 1:5. Seguidamente, se

registraron los espectros de fluorescencia tras excitar las mezclas a 340 nm.

#### 5.4.3. Simulación y cálculos de acoplamiento molecular

Los cálculos de simulación dinámica de acoplamiento molecular se realizaron en colaboración con la Prof. Concepción González Bello y el Dr. Emilio Lence del *Centro Singular de Investigación en Química Biológica e Materiais Moleculares* (CiQUS) del Departamento de Química orgánica de la Universidad de Santiago de Compostela. Para ello, se utilizó el programa GOLD (versión 2020.2.0)<sup>26</sup> con el fin de estudiar el acoplamiento molecular, utilizando la estructura cristalina de HSA formando el complejo con la hemina y el ácido mirístico (entrada 1O9X en PDB)<sup>6,27</sup> y de la estructura cristalina de HAG (PBD ID 3KQ0)<sup>28</sup>. Seguidamente, los complejos se sometieron a 100 ns de simulación dinámica utilizando el campo de fuerza mecánica molecular AMBER ff14SB y GAFF y se analizaron las trayectorias realizando un análisis de la raíz de la desviación cuadrática media (rmsd) para obtener las distancias medias relativas de las principales interacciones.<sup>29-31</sup> Se utilizó el programa de gráficos moleculares PyMOL24 para visualizar y representar estructuras enzimáticas.<sup>32</sup>

#### 5.4.4. Cálculo de las constantes de unión

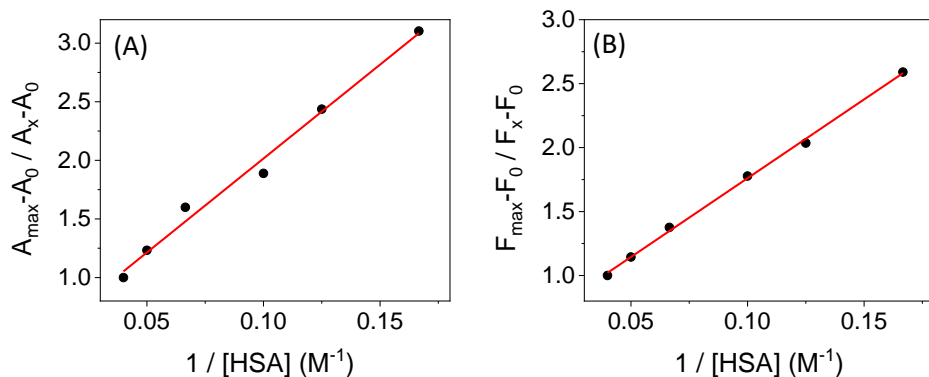
Existen distintas técnicas analíticas para calcular las constantes de unión ( $K_B$ ) entre un fármaco y una proteína; entre ellas, la espectroscopía de fluorescencia es una de las más utilizadas debido a su elevada sensibilidad y selectividad.<sup>7,8,33</sup> Así, los valores de  $K_B$  se han calculado a partir de medidas espectroscópicas tanto de fluorescencia como de absorción UV, aplicando posteriormente un análisis de Scatchard modificado.<sup>25</sup> Este análisis permite determinar los valores de  $K_B$  a partir de los espectros de

absorción y emisión de un ligando a concentración constante, añadiendo cantidades crecientes de proteína. Para poder aplicar este análisis, se debe asumir que no hay moléculas de ligando libres en disolución. Así pues, se realizaron medidas espectroscópicas de absorción y fluorescencia para disoluciones de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 en PBS a concentración constante de 6  $\mu\text{M}$ , añadiéndose de manera progresiva pequeñas alícuotas de disolución madre de proteína 2 mM en PBS, para tener concentraciones finales de 6, 8, 10, 15, 20 y 25  $\mu\text{M}$  para HSA y de 6, 8, 10, 12, 14, 18 y 22  $\mu\text{M}$  para HAG. Una vez registrados los espectros de absorción UV y de fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ ), se aplicó el análisis de Scatchard modificado para obtener los valores de las constantes de  $K_B$  (ver tabla 5.1). Para ello, se realizó un ajuste lineal según la ecuación 5.1 (ver figuras 5.17 a 5.22), donde  $F_{\text{máx}}$  es el valor máximo de emisión correspondiente al máximo ligando unido posible,  $F_0$  es el valor del máximo de emisión del ligando libre en disolución, y  $F_x$  es el valor del máximo de emisión a una concentración de proteína determinada  $[P]$ :

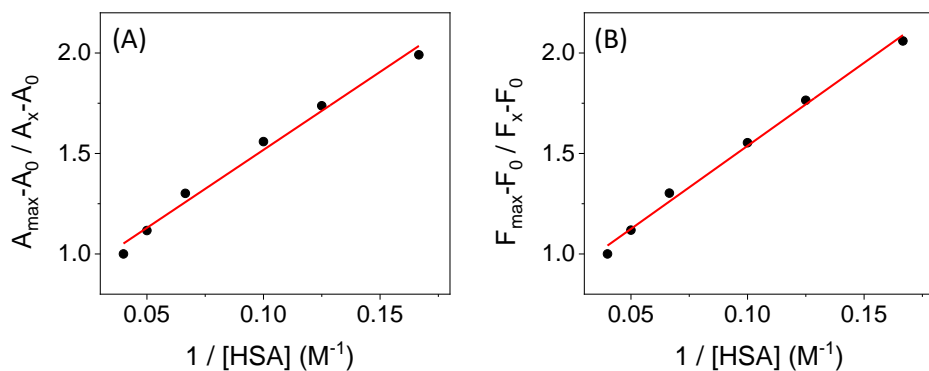
$$\frac{F_{\text{máx}} - F_0}{F_x - F_0} = 1 + \frac{1}{K_B} \cdot [P]^{-1} \quad (5.1)$$

Del mismo modo, se puede calcular  $K_B$  a partir de las absorbancias ( $A$ ), en lugar de los valores de fluorescencia ( $F$ ), correspondientes al ligando.

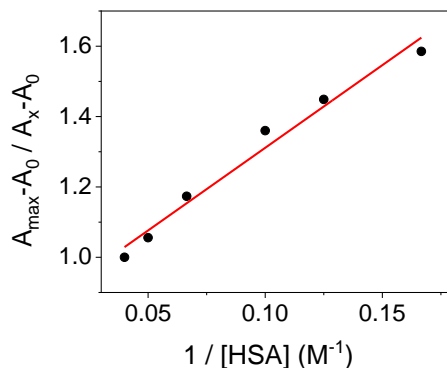




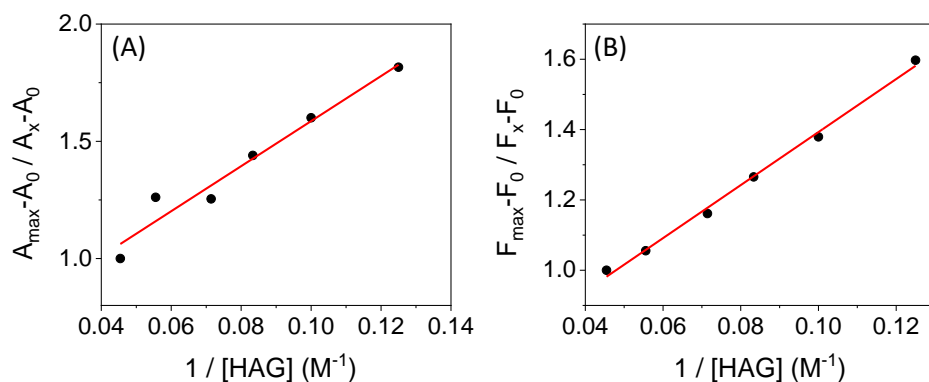
**Figura 5.17.** Ajuste lineal del análisis gráfico de Scatchard modificado para determinar los valores de  $K_B$  para GFT (6  $\mu\text{M}$ ) en HSA (6, 8, 10, 15, 20 y 25  $\mu\text{M}$ ) en PBS mediante espectroscopía de (A) absorción UV y (B) fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ ).



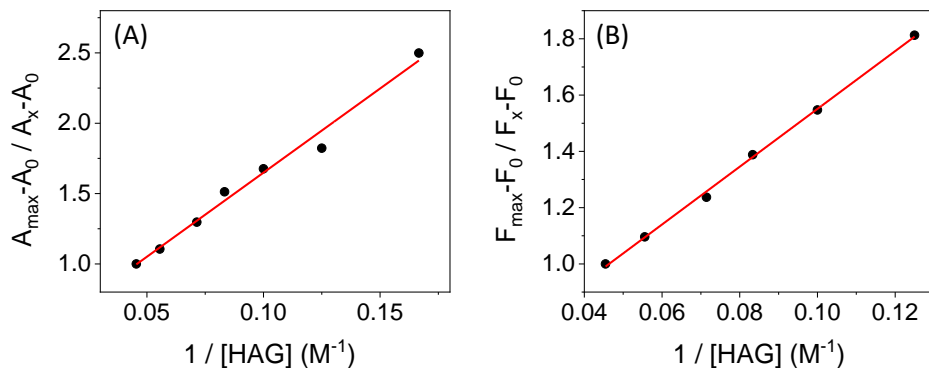
**Figura 5.18.** Ajuste lineal del análisis gráfico de Scatchard modificado para determinar los valores de  $K_B$  para GFT-M1 (6  $\mu\text{M}$ ) en HSA (6, 8, 10, 15, 20 y 25  $\mu\text{M}$ ) en PBS mediante espectroscopía de (A) absorción UV y (B) fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ ).



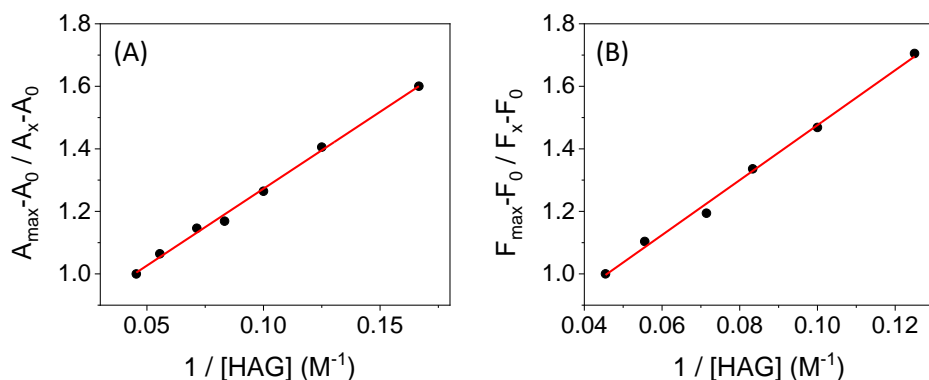
**Figura 5.19.** Ajuste lineal del análisis gráfico de Scatchard modificado para determinar los valores de  $K_B$  para GFT-M2 (6  $\mu\text{M}$ ) en HSA (6, 8, 10, 15, 20 y 25  $\mu\text{M}$ ) en PBS mediante espectroscopía de absorción UV.



**Figura 5.20.** Ajuste lineal del análisis gráfico de Scatchard modificado para determinar los valores de  $K_B$  para GFT (6  $\mu\text{M}$ ) en HAG (6, 8, 10, 12, 14, 18 y 22  $\mu\text{M}$ ) en PBS mediante espectroscopía de (A) absorción UV y (B) fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ ).



**Figura 5.21.** Ajuste lineal del análisis gráfico de Scatchard modificado para determinar los valores de  $K_B$  para GFT-M1 (6  $\mu\text{M}$ ) en HAG (6, 8, 10, 12, 14, 18 y 22  $\mu\text{M}$ ) en PBS mediante espectroscopía de (A) absorción UV y (B) fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ ).



**Figura 5.22.** Ajuste lineal del análisis gráfico de Scatchard modificado para determinar los valores de  $K_B$  para GFT-M2 (6  $\mu\text{M}$ ) con HAG (6, 8, 10, 12, 14, 18 y 22  $\mu\text{M}$ ) en PBS mediante espectroscopía de (A) absorción UV y (B) fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ ).

#### 5.4.5. Medidas espectroscópicas

En este capítulo se han estudiado las interacciones de GFT, GFT-M1 o GFT-M2 con los aminoácidos de los sitios de unión de HSA y HAG haciendo uso de técnicas espectroscópicas tales como la absorción UV-Vis y la fluorescencia en estado estacionario, las cuales se explican en detalle en el Anexo II – Técnicas espectroscópicas y metodología general.

Las disoluciones de GFT y/o de sus metabolitos en disolución acuosa de tampón fosfato (PBS) se prepararon a partir de disoluciones madre en DMSO, cuyo contenido en la disolución final se mantuvo por debajo del 2% en volumen%; se ha visto que esta cantidad ayuda a solubilizar los compuestos sin alterar sus propiedades fotofísicas. En lo que respecta a las condiciones experimentales, las medidas se realizaron en atmósfera de aire a 25 °C. La fluorescencia se registró a  $\lambda_{\text{exc}} = 340$  nm, manteniendo la absorbancia por debajo de 0.1 a dicha longitud de onda. Para los complejos fármaco o metabolito@proteína se prepararon disoluciones a relación molar 1:1 a concentración de 10  $\mu\text{M}$ .

## 5.5 REFERENCIAS

- (1) Vayá, I.; Lhiaubet-Vallet, V.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. Photoactive Assemblies of Organic Compounds and Biomolecules: Drug-Protein Supramolecular Systems. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (12), 4102–4122.
- (2) Vayá, I.; Andreu, I.; Monje, V. T.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. Mechanistic Studies on the Photoallergy Mediated by Fenofibric Acid: Photoreactivity with Serum Albumins. *Chem. Res. Toxicol.* **2016**, *29* (1), 40–46.
- (3) Vayá, I.; Bonancía, P.; Jiménez, M. C.; Markovitsi, D.; Gustavsson, T.; Miranda, M. A. Excited State Interactions between Flurbiprofen and Tryptophan in Drug-Protein Complexes and in Model Dyads. Fluorescence Studies from the Femtosecond to the Nanosecond Time Domains. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (13), 4727–4734.
- (4) Vayá, I.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. Excited-State Interactions in Flurbiprofen-Tryptophan Dyads. *J. Phys. Chem.* **2007**, *111* (31), 9363–9371.
- (5) Vayá, I.; Andreu, I.; Lence, E.; González-Bello, C.; Consuelo Cuquerella, M.; Navarrete-Miguel, M.; Roca-Sanjuán, D.; Miranda, M. A. Characterization of Locally Excited and Charge-Transfer States of the Anticancer Drug Lapatinib by Ultrafast Spectroscopy and Computational Studies. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26* (68), 15922–15930.
- (6) Andreu, I.; Lence, E.; González-Bello, C.; Mayorga, C.; Cuquerella, M. C.; Vayá, I.; Miranda, M. A. Protein Binding of Lapatinib and Its N- and O-Dealkylated Metabolites Interrogated by Fluorescence, Ultrafast

Spectroscopy and Molecular Dynamics Simulations. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11* (576495).

- (7) Dos Santos Rodrigues, F. H.; Delgado, G. G.; Santana da Costa, T.; Tasic, L. Applications of Fluorescence Spectroscopy in Protein Conformational Changes and Intermolecular Contacts. *BBA Adv.* **2023**, *3* (100091).
- (8) Vuignier, K.; Schappler, J.; Veuthey, J. L.; Carrupt, P. A.; Martel, S. Drug-Protein Binding: A Critical Review of Analytical Tools. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398* (1), 53–66.
- (9) Pérez-Ruiz, R.; Lence, E.; Andreu, I.; Limones-Herrero, D.; González-Bello, C.; Miranda, M. A.; Jiménez, M. C. A New Pathway for Protein Haptenation by  $\beta$ -Lactams. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (56), 13986–13994.
- (10) Spitaleri, A.; Rocchia, W. Molecular Dynamics–Based Approaches Describing Protein. In *Biomolecular Simulations in Structure-Based Drug Discovery*, Gervasio, F. L., Spiwok, V., Eds.; Eds. Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2019; pp 29–39.
- (11) Sudlow, G.; Birkett, D.; Wade, D. The Characterization of Two Specific Drug Binding Sites on Human Serum Albumin. *Mol. Pharmacol.* **1975**, *11* (6), 824.
- (12) Kragh-Hansen, U.; Tuan Giam Chuang, V.; Otagiri, M. Practical Aspects of the Ligand-Binding and Enzymatic Properties of Human Serum Albumin. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25* (6), 695–704.

- (13) Itoh, T.; Saura, Y.; Tsuda, Y.; Yamada, H. Stereoselectivity and Enantiomer-Enantiomer Interactions in the Binding of Ibuprofen to Human Serum Albumin. *Chirality* **1997**, *9* (7), 643–649.
- (14) Wybranowski, T.; Cyrankiewicz, M.; Ziolkowska, B.; Kruszewski, S. The HSA Affinity of Warfarin and Flurbiprofen Determined by Fluorescence Anisotropy Measurements of Camptothecin. *Biosystems* **2008**, *94* (3), 258–262.
- (15) Amézqueta, S.; Beltrán, J. L.; Bolioli, A. M.; Campos - vicens, L.; Luque, F. J.; Ràfols, C. Evaluation of the Interactions between Human Serum Albumin (Hsa) and Non - steroidal Anti - inflammatory (Nsaids) Drugs by Multiwavelength Molecular Fluorescence, Structural and Computational Analysis. *Pharmaceuticals* **2021**, *14* (3).
- (16) Rimac, H.; Dufour, C.; Debeljak, Ž.; Zorc, B.; Bojić, M. Warfarin and Flavonoids Do Not Share the Same Binding Region in Binding to the IIA Subdomain of Human Serum Albumin. *Molecules* **2017**, *22* (7).
- (17) Hage, D. S.; Noctor, T. A. G.; Wainer, I. W. Characterization of the Protein Binding of Chiral Drugs by High-Performance Affinity Chromatography Interactions of R-and S-Ibuprofen with Human Serum Albumin. *J. Chromatogr. A* **1995**, *693*, 23–32.
- (18) Ràfols, C.; Amézqueta, S.; Fuguet, E.; Bosch, E. Molecular Interactions between Warfarin and Human (HSA) or Bovine (BSA) Serum Albumin Evaluated by Isothermal Titration Calorimetry (ITC), Fluorescence Spectrometry (FS) and Frontal Analysis Capillary Electrophoresis (FA/CE). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *150*, 452–459.

- (19) Kabir, M. Z.; Tee, W. V.; Mohamad, S. B.; Alias, Z.; Tayyab, S. Interaction of an Anticancer Drug, Gefitinib with Human Serum Albumin: Insights from Fluorescence Spectroscopy and Computational Modeling Analysis. *RSC Adv.* **2016**, *6* (94), 91756–91767.
- (20) Dömötör, O.; Pelivan, K.; Borics, A.; Keppler, B. K.; Kowol, C. R.; Enyedy, É. A. Comparative Studies on the Human Serum Albumin Binding of the Clinically Approved EGFR Inhibitors Gefitinib, Erlotinib, Afatinib, Osimertinib and the Investigational Inhibitor KP2187. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *154*, 321–331.
- (21) Li, J.; Brahmer, J.; Messersmith, W.; Hidalgo, M.; Baker, S. D. Binding of Gefitinib, an Inhibitor of Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase, to Plasma Proteins and Blood Cells: In Vitro and in Cancer Patients. *Invest. New Drugs* **2006**, *24* (4), 291–297.
- (22) Tanzadehpanah, H.; Mahaki, H.; Moghadam, N. H.; Salehzadeh, S.; Rajabi, O.; Najafi, R.; Amini, R.; Saidijam, M. Binding Site Identification of Anticancer Drug Gefitinib to HSA and DNA in the Presence of Five Different Probes. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2019**, *37* (4), 823–836.
- (23) Wu, D.; Yan, J.; Sun, P.; Xu, K.; Li, S.; Yang, H.; Li, H. Comparative Analysis of the Interaction of Capecitabine and Gefitinib with Human Serum Albumin Using <sup>19</sup>F Nuclear Magnetic Resonance-Based Approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *129*, 15–20.
- (24) Tanzadehpanah, H.; Mahaki, H.; Moradi, M.; Afshar, S.; Rajabi, O.; Najafi, R.; Amini, R.; Saidijam, M. Human Serum Albumin Binding and



- Synergistic Effects of Gefitinib in Combination with Regorafenib on Colorectal Cancer Cell Lines. *Colorect. Cancer* **2018**, *7*(2), CRC03.
- (25) Healy, E. F. Quantitative Determination of DNA-Ligand Binding Using Fluorescence Spectroscopy. *J. Chem. Educ.* **2007**, *84*(8), 1304–1307.
- (26) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking; 1997.
- (27) Zunszain, P. A.; Ghuman, J.; Komatsu, T.; Tsuchida, E.; Curry, S. Crystal Structural Analysis of Human Serum Albumin Complexed with Hemin and Fatty Acid. *BMC Struct. Biol.* **2003**, *3*(6).
- (28) Schönfeld, D. L.; Ravelli, R. B. G.; Mueller, U.; Skerra, A. The 1.8-Å Crystal Structure of A1-Acid Glycoprotein (Orosomuroid) Solved by UV RIP Reveals the Broad Drug-Binding Activity of This Human Plasma Lipocalin. *J. Mol. Biol.* **2008**, *384*(2), 393–405.
- (29) Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Automatic Atom Type and Bond Type Perception in Molecular Mechanical Calculations. *J. Mol. Graph. Model.* **2006**, *25*(2), 247–260.
- (30) Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and Testing of a General Amber Force Field. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*(9), 1157–1174.
- (31) Case, D. A.; Aktulga, H. M.; Belfon, K.; Ben-Shalom, I. Y.; Berryman, J. T.; Brozell, S. R.; Cerutti, D. S.; Cheatham, T. E.; III; Cisneros, G. A.; Cruzeiro, V. W. D.; Darden, T. A.; Duke, R. E.; Giambasu, G.; Gilson, M. K.; Gohlke, H.; Goetz, A. W.; Harris, R.; Izadi, S.; Izmailov, S. A.; Kasavajhala, K.; Kaymak, M. C.; King, E.; Kovalenko, A.; Kurtzman, T.; Lee, T. S.;

LeGrand, S.; Li, P.; Lin, C.; Liu, J.; Luchko, T.; Luo, R.; Machado, M.; Man, V.; Manathunga, M.; Merz, K. M.; Miao, Y.; Mikhailovskii, O.; Monard, G.; Nguyen, H.; O'Hearn, K. A.; Onufriev, A.; Pan, F.; Pantano, S.; Qi, R.; Rahnamoun, A.; Roe, D. R.; Roitberg, A.; Sagui, C.; Schott-Verdugo, S.; Shajan, A.; Shen, J.; Simmerling, C. L.; Skrynnikov, N. R.; Smith, J.; Swails, J.; Walker, R. C.; Wang, J.; Wang, J.; Wei, H.; Wolf, R. M.; Wu, X.; Xiong, Y.; Xue, Y.; York, D. M.; Zhao, S.; Kollman, P. A. Amber 2022; University of California, San Francisco, 2022.

(32) DeLano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific LLC: Palo Alto, CA, 2008; <http://www.pymol.org/>, 2021.

(33) Hirose, K. A Practical Guide for the Determination of Binding Constants. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2001**, *39*, 193–209.







## Capítulo 6. Conclusiones





En esta tesis doctoral se ha estudiado el comportamiento fotofísico del fármaco anticancerígeno gefitinib (GFT) y de sus metabolitos fenólicos *O*-desmorfolinopropil gefitinib (GFT-M1) y *O*-desmetil gefitinib (GFT-M2) en distintos medios: en disolución orgánica y en medios confinados, concretamente en presencia de proteínas transportadoras. En cuanto a los primeros, se han utilizado disolventes orgánicos con polaridades diferentes (etanol, acetonitrilo, 1,4-dioxano, tolueno y ciclohexano) con el fin de caracterizar con el mayor detalle posible los estados excitados y los procesos fotoinducidos que ocurren tras excitar el fármaco y/o los metabolitos con luz UV-A. Respecto a las proteínas, se han escogido la albúmina sérica humana (HSA) y la  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida humana (HAG) por ser de las proteínas transportadoras más importantes y abundantes en el torrente sanguíneo, además de haber sido utilizadas en numerosos estudios como sistemas biológicos de referencia para investigar con detalle las interacciones fármaco@proteína, así como el daño fotosensibilizado que se puede generar tras irradiar con luz UV-A. Adicionalmente, se llevó a cabo un estudio teórico de simulación de acoplamiento molecular (MD) para investigar con detalle la interacción del fármaco y de sus metabolitos con HSA y HAG, con el fin de entender mejor la fotorreactividad observada y tratar de establecer una conexión entre el comportamiento fotofísico y el potencial fotosensibilizante de GFT, GFT-M1 y GFT-M2.

En general, en disolución orgánica, GFT y sus metabolitos muestran un comportamiento fotofísico muy similar, siendo las principales especies formadas tras la excitación de éstos las que se detallan a continuación:

- En medio orgánico apolar se forman estados excitados localizados (LE) de naturaleza singlete, los cuales evolucionan hacia la formación de estados excitados triplete. Así, se han detectado y caracterizado los

estados LE mediante espectroscopía de fluorescencia en estado estacionario y de resolución temporal, obteniendo tiempos de vida relativamente cortos ( $\sim 1$  ns), con máximos de emisión *ca.* 380 nm. En cuanto a los estados triplete ( $\lambda_{\text{máx}}$  *ca.* 610 nm), se han caracterizado mediante fotólisis de destello láser, confirmando así su naturaleza con experimentos de fotosensibilización.

- En medio orgánico polar, se ha detectado mediante espectroscopía de absorción transitoria a escala de femtosegundos, que los estados LE evolucionan muy rápidamente (*ca.* 1 ps) hacia la formación de complejos de transferencia de carga intramolecular (ICT), que finalmente forman estados excitados triplete. También, utilizando la técnica de fluorescencia, se han detectado los estados ICT, que muestran rendimientos cuánticos menores, espectros más desestructurados con máximo a longitudes de onda mayores ( $\sim 470$  nm), y tiempos de vida más largos ( $\sim 3$  ns) que los observados para LE.

En proteínas, sin embargo, el comportamiento fotofísico de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 varía considerablemente entre ellos y, además, se ve muy condicionado por el microambiente que rodea a la molécula, observándose diferencias significativas en función de la proteína con la que interaccionan. Así, los resultados obtenidos muestran que:

- Las principales especies formadas tras excitar selectivamente a GFT en el interior de HSA o de HAG son los estados LE de naturaleza singlete, los cuales emiten a  $\lambda_{\text{máx}} \sim 390$  nm, con tiempos de vida de *ca.* 1 ns. Estos estados se pueden desactivar por un proceso de transferencia electrónica (eT) desde dadores adecuados, como son el triptófano (Trp) o la tirosina (Tyr) del interior de la proteína. Así, tras aplicar la ecuación de Rehm-Weller se determina que el proceso es



termodinámicamente favorable. Estudios de fluorescencia de mezclas GFT/Tyr y GFT/Trp confirman que este proceso ocurre, ya que se observa una desactivación dinámica de  $^1\text{GFT}^*$  con cantidades crecientes de aminoácido. Este proceso puede explicar la baja formación de estados excitados triplete en el interior de HSA, ya que el proceso de eT ocurre a tiempos mucho más cortos ( $\sim 5$  ps) que el del cruce intersistemas ( $\sim 10$  ps), ambos detectados por FTA.

- Para GFT-M1@HSA, sin embargo, la interacción más relevante viene dada por un puente de hidrógeno entre el grupo fenol de la quinazolina y el aminoácido Val116 del sitio 3 de HSA; esta interacción facilita un proceso de transferencia de protón fotoinducido y como consecuencia de ello se generan especies tipo fenolato en el estado excitado. Éstas presentan rendimientos cuánticos de fluorescencia más altos que los obtenidos para los estados LE, emitiendo a longitudes de onda mayores ( $\lambda_{\text{máx}} \sim 430$  nm) y con tiempos de vida más largos (*ca.* 2.5 ns). Este hecho podría estar relacionado con que el potencial fotosensibilizante de GFT-M1 sea superior al de GFT y GFT-M2. Por el contrario, la orientación de GFT-M1 en el interior de HAG dificulta la interacción entre el grupo fenol de la quinazolina y los aminoácidos del interior de la proteína y, por tanto, se forman estados LE en mayor proporción, aunque también se generan especies tipo fenolato. De nuevo, la excitación de GFT-M1 en el interior de las proteínas no genera estados triplete, pues los procesos que tienen lugar son más rápidos que el cruce intersistemas.
- En relación a GFT-M2, se observa un comportamiento totalmente distinto a GFT-M1, a pesar de ser también un fenol. Así, en HSA, se forman principalmente estados LE, mientras que en HAG el metabolito se orienta en sentido opuesto a GFT-M1, lo que le permite establecer interacciones por puente de hidrógeno con H97. Como consecuencia,

se forman especies tipo fenolato en mayor proporción. Cabe destacar que, al igual que GFT y GFT-M1, la excitación de GFT-M2@proteína no genera estados excitados triplete.

Con todo ello, se han identificado y caracterizado las principales especies transitorias, así como estudiado los procesos fotoinducidos que ocurren tras la irradiación de GFT, GFT-M1 y GFT-M2 con luz UV-A. Además, se ha investigado la interacción del fármaco y sus metabolitos fenólicos con las proteínas HSA y HAG combinando distintas técnicas espectroscópicas con cálculos teóricos de acoplamiento molecular. Finalmente, se ha podido correlacionar el comportamiento fotofísico de los tres compuestos estudiados con sus potenciales fototóxicos. Así, cabe esperar que el daño fotosensibilizado generado por el fármaco y por sus metabolitos siga un mecanismo de tipo I, puesto que se han observado procesos de transferencia electrónica y/o de protón.







## **Anexo I. Difusión de los resultados y otras publicaciones**





La difusión de resultados es una de las partes más importantes en investigación, pues es necesaria para que la comunidad científica avance hacia un conocimiento global. En este sentido, los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis doctoral han sido publicados en revistas científicas de alto impacto y se han presentado en congresos y eventos tanto a nivel nacional como internacional. Adicionalmente, se han publicado otros artículos que no están directamente relacionados con la presente tesis, y que son resultantes de colaboraciones, firmando como primera o como segunda autora.

A continuación, se listan los artículos científicos que derivan de resultados directamente relacionados con esta tesis doctoral, así como de colaboraciones llevadas a cabo en paralelo a la tesis. Seguidamente, se listan los congresos en los que he participado. Los artículos publicados (o enviados) que incluyen los trabajos desarrollados para esta tesis doctoral se incluyen al final de este anexo.

### **Artículos publicados**

1. **Lorena Tamarit**, Meryem El Ouardi, Emilio Lence, Inmaculada Andreu, Concepción González-Bello, Ignacio Vayá y Miguel A. Miranda.

Modulation of the photobehavior of gefitinib and its phenolic metabolites by human transport proteins

*Front. Pharmacol.*, artículo enviado.

Q1, IF 5.6 (2022).

2. **Lorena Tamarit**, Meryem El Ouardi, Emilio Lence, Inmaculada Andreu, Concepción González-Bello, Ignacio Vayá y Miguel A. Miranda.

Switching from ultrafast electron transfer to proton transfer in excited drug–protein complexes upon biotransformation

*Chem. Sci.* **2022**, *13*, 9644. DOI: 10.1039/d2sc03257k

Q1, IF 9.97 (2021).

3. **Lorena Tamarit**, Meryem El Ouardi, Inmaculada Andreu, Ignacio Vayá y Miguel A. Miranda.

Photoprocesses of the tyrosine kinase inhibitor gefitinib: from femtoseconds to microseconds and from solution to cells

*Chem. Sci.* **2021**, *12*, 12027. DOI: 10.1039/d1sc03154f

Q1, IF 9.83 (2020).

### Otros artículos

En paralelo a los trabajos realizados para esta tesis doctoral, se han llevado a cabo colaboraciones cuyos resultados se han podido publicar en revistas científicas de alto impacto. Dichos artículos son los siguientes:

1. Alejandro Blasco-Brussola, **Lorena Tamarit**, Miriam Navarrete-Miguel, Daniel Roca-Sanjuán, Miguel A. Miranda, Ignacio Vayá.

Photolytic splitting of homodimeric quinone-derived oxetanes studied by ultrafast transient absorption spectroscopy and quantum chemistry

*Phys. Chem. Chem. Phys.*, artículo enviado.

Q3, IF 3.3 (2022).

2. Meryem El Ouardi, **Lorena Tamarit**, Ignacio Vayá, Miguel A. Miranda e Inmaculada Andreu.

Cellular photo(genoto)xicity of gefitinib after biotransformation

*Front Pharmacol* **2023**, *14*, 1208075. DOI: 10.3389/fphar.2023.1208075

Q1, IF 5.6 (2022).

3. **Lorena Tamarit**, Laura García-Gabarda, M. Consuelo Jiménez, Miguel A. Miranda y Ignacio Vayá.



Topological effects in ultrafast photoinduced processes between flurbiprofen and tryptophan in linked dyads and within human serum albumin

*Phys Chem Chem Phys* **2023**, *25*, 16148. DOI: 10.1039/D3CP01082A  
Q2, IF 3.3 (2022).

### Participación en congresos

1. **Lorena Tamarit**, Meryem El Ouardi, Emilio Lence, Inmaculada Andreu, Concepción González-Bello, Ignacio Vayá Pérez y Miguel A. Miranda Alonso.

Oral: *Switching from ultrafast electron transfer to proton transfer in excited drug-protein complexes upon biotransformation*

X Reunión de Química Orgánica del Mediterráneo (X REQOMED)

Valencia (España), 19-21 de octubre de 2022.

2. **Lorena Tamarit**, Meryem El Ouardi, Inmaculada Andreu, Ignacio Vayá y Miguel A. Miranda.

Póster: *Photoreactivity of anticancer drugs and the main photoactive metabolites in solution and in biological media*

XXXVIII Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química

Granada (España), 27-30 de junio de 2022.

3. **Lorena Tamarit**, Meryem El Ouardi, Inmaculada Andreu, Ignacio Vayá y Miguel A. Miranda.

Oral: *Procesos fotofísicos del inhibidor de la tirosina quinasa gefitinib en diferentes medios*

4th ITQ Winter Meeting

Valencia (España), 10 de diciembre de 2021.

4. **Lorena Tamarit**, Meryem El Ouardi, Inmaculada Andreu, Ignacio Vayá y Miguel A. Miranda.

Oral: *Photobehavior of the tyrosine-kinase inhibitor gefitinib in solution and within human serum albumin*

19<sup>th</sup> Congress of the European Society for Photobiology

World Wide Web, 30 de agosto - 3 de septiembre de 2021.

5. **Lorena Tamarit**, Ignacio Vayá y Miguel A. Miranda.

Póster: *Photophysical properties of the tyrosine-kinase inhibitor gefitinib in solution and complexed with proteins*

Photochemistry School 2020

Live online, 7-9 de septiembre 2020 de 2021.

6. **Lorena Tamarit**, Ignacio Vayá y Miguel A. Miranda.

Oral: *Photobehavior of the tyrosine-kinase inhibitor gefitinib and its main metabolites*

3rd ITQ Winter Meeting

Valencia (España), 17 de diciembre de 2020.

7. **Lorena Tamarit**, Ignacio Vayá y Miguel A. Miranda.

Póster: *Photophysical and photochemical studies of drug@protein complexes in different media*


XVI Simposio Jóvenes Investigadores Químicos

Valencia (España), 4-7 de noviembre de 2019.

Adicionalmente, se participó en la sesión de pósteres que tuvo lugar durante la 6<sup>th</sup> ESP PHOTOBIOLOGY SCHOOL organizada por la *European Society for Photobiology* del 21 al 27 de agosto del 2022 en Brixen/Bressanone (Italia).

Artículos de la tesis en formato publicado



Cite this: *Chem. Sci.*, 2021, 12, 12027 All publication charges for this article have been paid for by the Royal Society of Chemistry

# Photoprocesses of the tyrosine kinase inhibitor gefitinib: from femtoseconds to microseconds and from solution to cells†

Lorena Tamarit,<sup>1</sup> Meryem El Ouardi,<sup>1,ab</sup> Inmaculada Andreu,<sup>1,ab</sup> Ignacio Vayá<sup>1</sup> and Miguel A. Miranda<sup>1</sup>

Gefitinib (GFT) is a tyrosine kinase inhibitor currently used for the treatment of metastatic non-small cell lung cancer. Although it has been suggested that GFT can be phototoxic, there are no systematic studies on this issue. Here, the photosensitizing potential of GFT has been assessed by means of NRU assays and protein photooxidation. In addition, a thorough photophysical study is presented based on ultrafast transient absorption spectroscopy, fluorescence and laser flash photolysis. Transient species generated after excitation of GFT have been characterized in solution and in biological environments (*i.e.* HSA and HaCaT cells) to gain insight into the mechanisms involved in photodamage. The photobehavior of GFT was strongly medium-dependent. Excitation of the drug resulted in the formation of locally excited (LE) singlet states (<sup>1</sup>GFT\*), which were found to be the main emissive species in non-polar solvents and also within HSA and HaCaT cells. By contrast, in polar solvents, LE states rapidly evolved (~1 ps) towards the formation of longer-lived intramolecular charge transfer (ICT) states. The triplet excited state of GFT (<sup>3</sup>GFT\*) can be formed through intersystem crossing from <sup>1</sup>GFT\* in non-polar solvents and from ICT states in the polar ones, or in the particular case of ethanol, by photosensitization using 2-methoxyacetophenone as an energy donor. In the HSA environment, <sup>3</sup>GFT\* was hardly detected due to quenching of its LE <sup>1</sup>GFT\* precursor by Trp through an electron transfer process. Accordingly, HSA photooxidation by GFT was demonstrated using the protein carbonylation method. In summary, a good correlation is established between the photophysical behavior and the photobiological properties of GFT, which provides a mechanistic basis for the observed phototoxicity.

Received 10th June 2021  
Accepted 13th July 2021

DOI: 10.1039/d1sc03154f

rsc.li/chemical-science

## Introduction

The epidermal growth factor receptor (EGFR) family is composed of four members (HER1–4), which are transmembrane glycoproteins with tyrosine kinase activity. They are able to regulate a number of signaling pathways within cells including cell proliferation, migration, differentiation, tissue repair and wound healing.<sup>1,2</sup> Mutations and overexpression of tyrosine kinase receptors, especially HER1 and HER2, may result in the appearance of different types of cancers and may promote solid tumor growth.<sup>3</sup> Therefore, EGFRs are major targets for the design of anticancer agents. In this regard,

tyrosine kinase inhibitors (TKIs) are of high interest due to their ability to block the kinase activity of these receptors.<sup>4–8</sup>

Gefitinib (GFT) is an orally active first-generation TKI.<sup>9</sup> It is clinically used for patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer; the mode of action involves specific binding of GFT to the ATP site of HER1 preventing autophosphorylation in tumor cells.<sup>10</sup> Although the benefits of this drug are evident, it can also induce adverse effects, which are normally associated with rash, diarrhea, dry skin, nausea and vomiting.<sup>11</sup>

Many drugs are known to absorb solar radiation and can induce photosensitivity reactions, such as phototoxicity or photoallergy, but also photoaging, weakening of the immune system and skin cancer.<sup>12</sup> These side effects can be associated with damage to biomolecules (lipids, proteins and DNA) caused by radicals or reactive oxygen species (ROS) arising from excited singlet or triplet states.<sup>13–15</sup> Interestingly, drugs containing the quinazoline moiety are known to produce photodermatitis.<sup>16</sup> In this regard, it has recently been reported that lapatinib (LAP), a TKI used for the treatment of breast and lung cancer, can induce protein photooxidation and phototoxicity.<sup>17</sup> The excited states arising from irradiation of LAP with UV light have been investigated by means of spectroscopic techniques in solution and in the presence of

<sup>a</sup>Departamento de Química/Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 València, Spain. E-mail: mmiranda@qim.upv.es; igvapre@qim.upv.es

<sup>b</sup>Unidad Mixta de Investigación, Universitat Politècnica de València, Instituto de Investigación Sanitaria (IIS) La Fe, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Avenida de Fernando Abril Martorell 106, 46026, València, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d1sc03154f



human serum albumin (HSA).<sup>18,19</sup> It has been shown that short-lived (ps scale) intramolecular charge transfer states (ICT) are formed in the bulk solution, while longer-lived locally excited (LE) states predominate in the protein-bound LAP; these states must be related to the photosensitizing potential of the drug.

In this context, preliminary *in vitro* studies suggest that GFT may be phototoxic,<sup>20</sup> although there are no reports about the involved photochemical mechanisms. In the present work, the photobiological response of GFT is investigated; thus, its phototoxic potential is evaluated by means of the NRU assay, while its photooxidation activity is assessed towards HSA, the main transport protein in human serum.<sup>21</sup> Besides, fluorescence and transient absorption spectroscopies from the femtosecond to the microsecond time-scale are used to investigate the photobehavior of GFT in solution and in the presence of HSA, in addition to human keratinocytes (HaCaT) cells. As a result, it has been observed that the excited state properties of the drug are strongly affected by the environment: LE states are mainly formed in organic non-polar solvents and within HSA or HaCaT cells, while ICT states are predominant in organic polar solvents. The triplet excited state of gefitinib (<sup>3</sup>GFT\*) has been identified and completely characterized for the first time, and its potential to generate ROS has been assessed. All these features are of key importance in connection with the photosensitizing potential of this drug.

## Experimental

### Chemicals and reagents

Gefitinib was purchased from Quimigen. Chlorpromazine hydrochloride (CPZ), sodium dodecyl sulphate (SDS), anthracene, human serum albumin (HSA) were purchased from Sigma-Aldrich. For cell culture experiments, HaCaT cells and Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), and penicillin–streptomycin ( $1.0 \times 10^5$  U mL<sup>-1</sup>,  $1.0 \times 10^5$  µg mL<sup>-1</sup>) were supplied by invitrogen. Trypsin–EDTA (0.25–0.02%) and glutamine solutions were provided by Cultiex. 2,4-Dinitrophenylhydrazine hydrochloride (DNPH) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA). PBS buffer was prepared by dissolving phosphate-buffered saline tablets (Sigma) using ultrapure water from a Millipore (Milli-Q Synthesis) system. Spectrophotometric HPLC solvents were obtained from Scharlab and used without further purification.

### Irradiation equipment

Irradiations were performed using a LCZ-4 photoreactor fitted with six top and eight side Hitachi lamps ( $\lambda_{\text{max}} = 350$  nm, Gaussian distribution; Luzchem, Canada). Irradiation for *in vitro* NRU assay was performed in 96-well transparent plates while 6-well transparent plates were used for photooxidation assay. All experiments were performed keeping the plates on ice inside the photoreactor to avoid overheating.

### Spectroscopic measurements

Steady-state absorption spectra were recorded in a JASCO V-760 spectrophotometer. Steady-state fluorescence spectra were

obtained using a JASCO spectrofluorometer system provided with a monochromator in the wavelength range 200–900 nm, with an excitation wavelength of 340 nm at 25 °C. Measurements on drug@protein complexes were performed in aerated PBS of 1 : 1 molar ratio mixtures at 10 µM. The absorbance of the samples at the excitation wavelength was kept below 0.1. Phosphorescence measurements were performed in a Photon Technology International (PTI, TimeMaster TM-2/2003) spectrophotometer equipped with a pulsed Xe lamp, operating in a time-resolved mode with a delay time of 0.5 ms. The sample was dissolved in ethanol, introduced in a quartz tube of 5 mm of diameter and cooled with liquid N<sub>2</sub> (77 K).

Time-resolved fluorescence measurements were performed using an EasyLife X system containing a sample compartment composed of an automated peltier cuvette holder to control the temperature, a pulsed LED excitation source and a lifetime detector. The employed LED excitation source was 340 nm, with an emission filter of WG370.

Laser Flash Photolysis (LFP) measurements were performed using a pulsed Nd:YAG L52137 V LOTIS TII at an excitation wavelength of 355 nm. The single pulses were *ca.* 10 ns duration, and the energy was ~12 mJ per pulse. The laser flash photolysis system consisted of the pulsed laser, a 77250 Oriol monochromator and an oscilloscope DP04054 Tektronix. The output signal from the oscilloscope was transferred to a personal computer. The absorbances of all solutions were adjusted at ~0.20 at 355 nm. All UV, fluorescence and LFP measurements were performed using 10 × 10 mm<sup>2</sup> quartz cuvettes at room temperature under deaerated conditions (25 min N<sub>2</sub> bubbling), or in the case of the protein complexes and/or singlet oxygen detection in an aerated atmosphere. Control experiments indicated that the degree of decomposition of the samples after photolysis was lower than 5%.

Femtosecond transient absorption experiments were performed using a typical pump-probe system. The femtosecond pulses were generated with a compact regenerative amplifier that produces pulses centered at 800 nm ( $\tau_{\text{pulse}} = 100$  fs approx., 1 mJ per pulse). The output of the laser was split into two parts to generate the pump and the probe beams. Thus, tunable femtosecond pump pulses were obtained by directing the 800 nm light into an optical parametric amplifier. In the present case, the pump was set at 330 nm and passed through a chopper prior to focusing onto a rotating cell (1 mm optical path) containing the samples in organic or aqueous solution. The white light used as a probe was produced after part of the 800 nm light from the amplifier travelled through a computer controlled 8 ns variable optical delay line and impinged on a CaF<sub>2</sub> rotating crystal. This white light was in turn split in two identical portions to generate reference and probe beams that then are focused on the rotating cell containing the sample. The pump and the probe were made to coincide to probe the sample. The power of the pump beam was set to 180 µW. Under these conditions, the degree of photodegradation of the samples was lower than 5%. A computer-controlled imaging spectrometer was placed after this path to measure the probe and the reference pulses to obtain the transient absorption decays/spectra.



The experimental data were treated and compensated by the chirp using the ExciPro program.

### Phototoxicity assay

A neutral Red Uptake phototoxicity test (NRU) was selected for the study of the cellular phototoxic properties of GFT. The assay was performed in accordance with the OECD Guideline 432 (OECD 2019) in HaCaT cells instead of the 3T3 cell line from BALB/c, the standard method, due to the similarity with human skin cells.<sup>22</sup>

The positive and negative phototoxic controls were CPZ and SDS, respectively. Chlorpromazine is a commonly used anti-psychotic drug which has demonstrated relevant phototoxic properties.<sup>23</sup> Briefly, two 96-well plates were seeded at a density of  $2.0 \times 10^4$  cells per well, and cells were treated the next day with GFT at eight concentrations ranging from 2.5 to 500  $\mu\text{M}$ . Additional plates were treated with CPZ (from 1.57  $\mu\text{M}$  to 500  $\mu\text{M}$ ) and SDS (from 3.13  $\mu\text{M}$  to 500  $\mu\text{M}$ ) as the references for this experiment. Then, one plate was irradiated with 5  $\text{J cm}^{-2}$  UVA dose (UVA light) whereas the other plate was kept in a dark box (DARK). The next day, cells were incubated with neutral red solution (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and further dye extraction from lysosomes was accomplished with a mix buffer [distilled water 50% (v/v), ethanol 49.5% (v/v) and acetic acid 0.5% (v/v)]. Afterwards, the absorbance of the plates was read at 540 nm on a Synergy H1 microplate reader. Dose–response curves for GFT and controls were obtained to determine the concentration causing a reduction of 50% of the neutral red uptake ( $\text{IC}_{50}$ ) under dark and UVA light conditions. Lastly, the photorirritation factor (PIF) values were calculated using the following equation:

$$\text{PIF} = \frac{\text{IC}_{50}\text{DARK}}{\text{IC}_{50}\text{UVA light}}$$

Conforming to OECD guideline 432, a substance is labelled as “non-phototoxic” when PIF is  $<2$ , “probably phototoxic” if PIF is between 2 and 5 and “phototoxic” if PIF is  $>5$ .

### Protein carbonyl content assay

Protein carbonyl content assay was carried out following the protocol described elsewhere,<sup>24</sup> but with minor modifications. Briefly, a solution of HSA (5  $\text{mg mL}^{-1}$ , 1  $\text{mg protein/sample}$ ) was prepared in PBS and irradiated alone or in the presence of 100  $\mu\text{M}$  of GFT followed by the exposure to UVA light at doses of 5, 10 and 15  $\text{J cm}^{-2}$ . Then, the amount of HSA oxidation was monitored spectrophotometrically after incubation of the samples with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) 10  $\text{mM}$  in order to generate quantifiable DNPH adducts. Later, proteins were precipitated with 20% trichloroacetic acid solution and a sequence of two washes was performed with ethanol/ethyl acetate 1 : 1 (v/v) containing 20% trichloroacetic acid. Finally, dried protein pellets were resolubilized with guanidine buffer (6 M) and absorbance was registered at 375 nm using a Synergy H1 microplate reader. Conclusively, the potential of protein oxidation was measured based on the content of carbonyl

generated (nmol of carbonyl per mg protein) in the presence of GFT.

## Results and discussion

As mentioned in the introduction, TKIs can exhibit photosensitizing potential in combination with sunlight.<sup>17</sup> Hence, it appeared interesting to assess the phototoxicity of GFT *in vitro* based on the established neutral red uptake (NRU) method. Thus, human keratinocytes were incubated with GFT and irradiated with a UVA light dose of 5  $\text{J cm}^{-2}$ . The cytotoxic profiles were determined by measurements of the irradiated samples in comparison with those kept in the dark, using neutral red as a vital dye. Thus, from the obtained dose–response curves (see Fig. S1 in the ESI<sup>†</sup>),  $\text{IC}_{50}$  was determined, and the photorirritation factor was calculated as the ratio of  $\text{IC}_{50}$  between dark and UVA conditions (see the Experimental section). The PIF value of GFT was found to be 13. Therefore, following the OECD 432 guide (OECD 2019), GFT can be considered a phototoxic drug (Fig. 1 and 2).

In view of the phototoxic potential of GFT, its photobehavior was studied by means of fluorescence and transient absorption spectroscopies. The photophysical properties of the drug were first investigated in organic solvents of different polarities. The UV absorption spectra barely varied from acetonitrile to

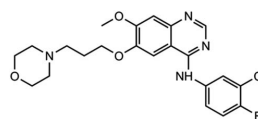


Fig. 1 Chemical structure of GFT.

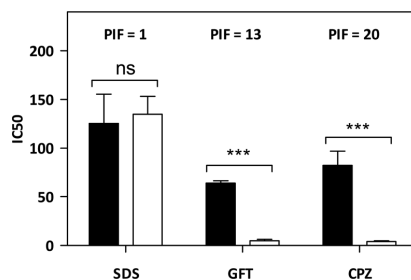


Fig. 2 *In vitro* phototoxicity of GFT in the NRU assay. The concentration causing a reduction of 50% of the neutral red uptake ( $\text{IC}_{50}$ ) was calculated both in the dark (filled bars) and under UVA light conditions (empty bars). The represented data correspond to the mean  $\pm$  SD from 4 independent dose–response curves. Chlorpromazine (CPZ) and sodium dodecyl sulfate (SDS) represent the selected positive and negative phototoxicity controls, respectively. The PIF value was determined from the ratio between  $\text{IC}_{50}$  dark and  $\text{IC}_{50}$  UVA for each compound. According to the OECD 432 guide (2019), PIF  $<2$  means “non-phototoxic”;  $2 < \text{PIF} < 5$  means “probable phototoxicity” and PIF  $>5$  means “phototoxicity”. Asterisks indicate significant differences by the t-Student test (ns: non-significant, \*\*\* $p < 0.001$ ).



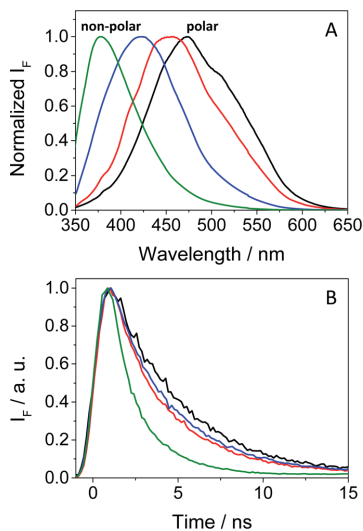


Fig. 3 Normalized fluorescence spectra (A) and decays (B) under aerated conditions for GFT in acetonitrile (black), 1,4-dioxane (red), toluene (blue) and cyclohexane (green) after excitation at 340 nm.

cyclohexane (see Fig. S2 in the ESI†) while the fluorescence properties were strongly affected by the polarity. This is in agreement with previous observations in *n*-hexane, chloroform or in alcohol solutions, where no detailed explanation was given.<sup>25,26</sup> The results show that the emission spectra of GFT were broad and unstructured in polar solvents (see Fig. 3A), displaying low quantum yield ( $\phi_F$ ) and peaking at long wavelengths ( $\lambda_{\max} > 450$  nm). By contrast,  $\phi_F$  values were much higher in non-polar solvents, and emission occurred at much shorter wavelengths with a lower fwhm (see Table 1). To give a comparison, the fluorescence quantum yield of GFT in acetonitrile was 0.05, with  $\lambda_{\max} \sim 473$  nm and a fwhm of about 118 nm, while in cyclohexane  $\phi_F$  was 0.19, and the spectrum showed a fwhm of ca. 71 nm and  $\lambda_{\max} \sim 378$  nm. In addition, the fluorescence decay kinetics (see Fig. 3B) showed the longest lifetime for the emitting species in acetonitrile, while the shortest one was detected in cyclohexane. Due to the short fluorescence lifetimes (1–3 ns), the presence or absence of oxygen had only a marginal effect (see Fig. S3 in the ESI†).

Table 1 Fluorescence properties of GFT in solvents of different polarities and within HSA and HaCaT cells at  $\lambda_{\text{exc}} = 340$  nm

	$\lambda_{\max}/\text{nm}$	fwhm/nm	$\phi_F^a$	$\tau_F/\text{ns}$
MeCN	473	118	0.05	3.4
1,4-Dioxane	458	116	0.09	2.5
Toluene	421	101	0.18	2.6
Cyclohexane	378	71	0.19	1.3
HSA	390	95	0.02	1.3
HaCaT cells	390	70	0.05	—

<sup>a</sup>  $\phi_F$  were determined using anthracene in ethanol as ref. 27.

The combined results from both steady-state and time-resolved measurements can be interpreted as emission from locally excited (LE) singlet states in non-polar solvents or from intramolecular charge transfer (ICT) states in the polar ones. The energy of LE in cyclohexane, determined from the crossing point between the normalized excitation and emission spectra (see Fig. S4 in the ESI†), was  $\sim 82$  kcal mol<sup>-1</sup>, while that of ICT in MeCN was roughly estimated to be of about 64 kcal mol<sup>-1</sup> from the bathochromic shift between the maxima spectra of cyclohexane and MeCN. At low temperatures, the fluorescence signal of GFT in a solid cyclohexane matrix at 77 K was very similar to that found in solution at 298 K. For acetonitrile, it was not possible to record the spectrum of a solid sample. Hence, low temperature measurements in a polar medium were performed in frozen ethanol, where two components were clearly distinguished in the 350–425 and 430–550 nm regions (see Fig. S5 in the ESI†), attributed to the LE and ICT states, respectively. From the wavelength corresponding to the first maximum of the ICT emission, a value of 65 kcal mol<sup>-1</sup> was obtained for the energy of this state, which is compatible with the 64 kcal mol<sup>-1</sup> estimated in MeCN from the bathochromic shift of the maximum (see above). In ethanol solution, at room temperature, the emission was very weak and no clear spectrum was recorded.

In order to get more insight into the formation of both LE and ICT states, femtosecond transient absorption measurements were performed on GFT in toluene, acetonitrile and ethanol (cyclohexane was not used due to solubility limitations). This is a highly sensitive technique which allows studying the formation of transient species in terms of spectral shape and kinetics resolution, and provides direct information on processes such as intersystem crossing (ISC), energy or electron transfer (ET) and charge separation.<sup>28–30</sup> Thus, excitation of the drug at 330 nm in toluene gave rise to an absorption band peaking at  $\lambda_{\max} \sim 460$  nm. It evolved through two nearly isobestic points (415 and 560 nm) towards the formation of a new band with two maxima ca. 605 and 410 nm (see Fig. 4A), which became clearly defined on the nanosecond scale. This band, mostly formed in about 10 ps (see Fig. S6 in the ESI†), can be tentatively ascribed to the triplet excited state of gefitinib (<sup>3</sup>GFT\*). By contrast, in acetonitrile, the band at around 460 nm evolved in about 1 ps towards other species with a maximum ca. 430 nm, which persisted up to the nanosecond scale (see Fig. 4B). This behavior is comparable to that previously observed for LAP in MeCN, where LE was the precursor species of the ICT state, formed in about 1.5 ps and decayed in the nanosecond time-scale.<sup>18</sup> Accordingly, a similar interpretation can be done for GFT in MeCN; thus, the band at 460 nm is associated with LE, while that at 430 nm to a ICT state. Interestingly, the transient absorption band at  $\sim 605$  nm was again visible on the ns scale, coexisting with that of ICT. A similar photobehavior was detected in ethanol; so, LE rapidly evolved (ca. 1.4 ps) towards the formation of ICT, which disappeared in about 700 ps (see Fig. 4C). Surprisingly, the long-lived band associated to <sup>3</sup>GFT\* with maxima around 410 and 605 nm was not detected.

In order to further characterize the excited species of the drug at longer time scales, nanosecond LFP measurements were





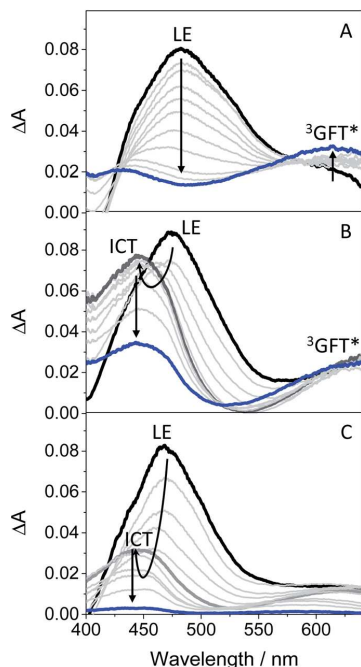


Fig. 4 Femtosecond transient absorption spectra of GFT in (A) toluene, (B) acetonitrile and (C) ethanol, after excitation at 330 nm. The spectra were recorded from 0.5 ps (black line) to 2 ns (blue line) in (A) and (B), and from 0.5 ps (black line) to 0.7 ns (blue line) in (C).

performed at  $\lambda_{\text{exc}} = 355$  nm. The transient spectra obtained in toluene showed two maxima around 400 and 600 nm (see Fig. 5A), very similar to those detected in the ns window from ultrafast spectroscopy; the two bands decayed in a similar manner (*ca.* 2  $\mu\text{s}$ ), indicating that both are associated with the same species in the excited state. The photobehavior in acetonitrile (see Fig. 5B) was very similar to that observed in toluene, but with slightly lower efficiency and the excited species displaying shorter lifetimes ( $\sim 1.7$   $\mu\text{s}$ ).

The signal at 600 nm, assigned to  $^3\text{GFT}^*$ , was strongly quenched by oxygen ( $k_{\text{O}} \sim 5.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). In order to better characterize its triplet nature, photosensitization LFP measurements using naproxen (NPX) as an acceptor were performed. The energy of  $^3\text{NPX}^*$  is 62 kcal mol $^{-1}$ ,<sup>31</sup> while that of  $^3\text{GFT}^*$ , determined from the 4% rise of its phosphorescence spectrum in a solid matrix of ethanol at 77 K (see Fig. S7 in the ESI $^\dagger$ ), was of about 69 kcal mol $^{-1}$ . Selective excitation of GFT at 355 nm in the presence of NPX resulted in a strong quenching of the signal at 600 nm with a concomitant formation of  $^3\text{NPX}^*$  ( $\lambda_{\text{max}} \sim 430$  nm) through a triplet–triplet energy transfer process from GFT to NPX (see Fig. S8 in the ESI $^\dagger$ ). Therefore, the transient band peaking at  $\sim 600$  nm can be undoubtedly assigned to the first triplet excited state of the drug. It is worth noting that  $^3\text{GFT}^*$  was much lower in ethanol (see Fig. S9 in the ESI $^\dagger$ ); all these results are in agreement with those obtained from ultrafast spectroscopy.

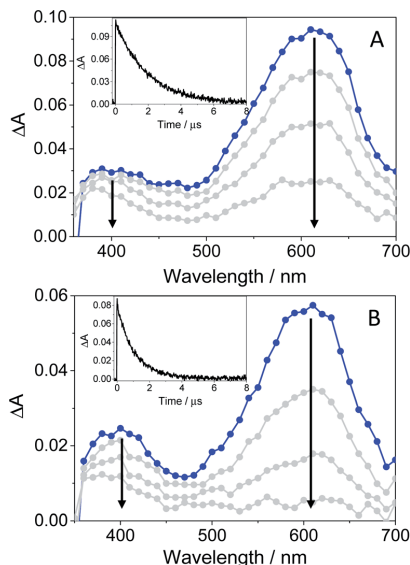


Fig. 5 LFP spectra (from 0.2 to 3  $\mu\text{s}$ ) and decay traces at 600 nm of GFT in toluene (A) and MeCN (B), after excitation at 355 nm under deaerated conditions.

In this context, an interesting point of discussion is the formation of  $^3\text{GFT}^*$  in both non-polar and polar solvents, as it can arise from different precursors (LE and/or ICT states, respectively). Interestingly, excitation of the drug in non-polar solvents such as toluene gives rise to LE states, which would evolve towards the formation of  $^3\text{GFT}^*$  in *ca.* 10 ps through ISC. In contrast, ICT predominates in polar solvents such as acetonitrile; therefore, in this case,  $^3\text{GFT}^*$  would be mainly formed from ICT rather than from LE states, as the latter disappear in a few ps. The minor formation of  $^3\text{GFT}^*$  in ethanol might be due to an enhanced stabilization of the ICT species, whose energy becomes lower than that of  $^3\text{GFT}^*$  (65 vs. 69 kcal mol $^{-1}$ ), resulting in an endothermic ISC. However, markedly higher formation of triplet gefitinib was accomplished through triplet–triplet energy transfer from 2-methoxyacetophenone (MAP) as the photosensitizer.<sup>32</sup> Thus, excitation of a mixture containing GFT and MAP in deaerated ethanol resulted in enhanced formation of  $^3\text{GFT}^*$  (see the difference spectrum in the inset in Fig. 6A). The growth and decay of this species at its absorption maximum (*ca.* 600 nm) are clearly shown in Fig. 6B.

From a photobiological point of view, triplet excited species are key intermediates that can induce damage to proteins and other biological targets.<sup>33</sup> This can involve radical pathways initiated by electron transfer or hydrogen abstraction (type I mechanism), and/or energy transfer from a photosensitizer to molecular oxygen, leading to singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$  type II mechanism).<sup>34,35</sup> In this context, it has been observed by means of LFP ( $\lambda_{\text{exc}} = 355$  nm) that GFT can induce formation of  $^1\text{O}_2$ , which has been detected by time-resolved NIR emission at 1270 nm. In



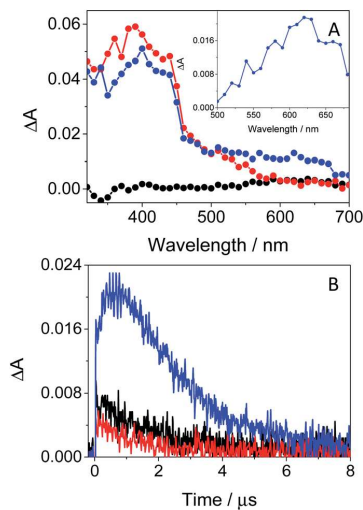


Fig. 6 (A) Transient absorption spectra of GFT (black), MAP (red) and a mixture of GFT/MAP (blue). The inset shows the spectrum obtained from subtraction of the MAP spectrum to that of the GFT/MAP spectrum 0.6  $\mu$ s after the laser pulse. (B) LFP decay traces at 610 nm for GFT (black), MAP (red) and a mixture of GFT/MAP. All measurements were performed in deaerated ethanol at  $\lambda_{exc} = 355$  nm at concentrations of 40  $\mu$ M for GFT and 30 mM for MAP.

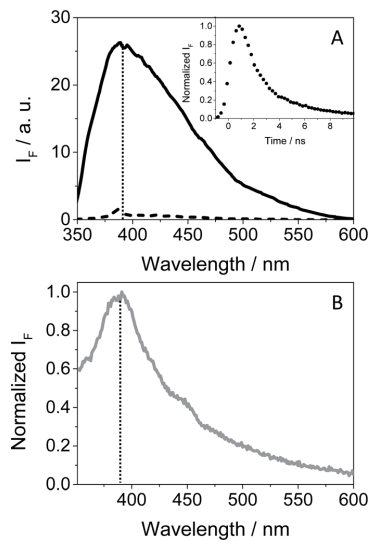


Fig. 7 (A) Fluorescence spectra of isoabsorptive solutions at the excitation wavelength for GFT in the bulk aqueous solution (dashed line) and GFT@HSA at 1 : 1 molar ratio (solid line). The inset shows the normalized fluorescence decay for GFT@HSA at 1 : 1 molar ratio (10  $\mu$ M) in PBS. (B) Normalized fluorescence spectra of GFT within HaCaT cells. All measurements were performed at  $\lambda_{exc} = 340$  nm. The vertical dotted line marks the maximum emission at ca. 390 nm.

the case of GFT, the singlet oxygen quantum yields, determined using ketoprofen as a reference,<sup>36</sup> were of about 0.17 and 0.1 in aerated toluene and MeCN, respectively; this agrees with the enhanced triplet formation in the former.

As GFT is phototoxic to cells (see above) and membrane proteins are major targets for photosensitized oxidation,<sup>37,38</sup> the photobehavior of GFT was investigated in the presence of human serum albumin, a model protein which is the most abundant in plasma.<sup>21</sup> It is known that GFT highly binds to HSA.<sup>39</sup> Selective excitation of the protein-bound gefitinib at 340 nm (see Fig. S10 in the ESI<sup>†</sup>) evidenced a significant enhancement of its fluorescence compared with the drug free in aqueous solution, which is insignificant (see Fig. 7A). The stronger emission of complexed gefitinib may result from the higher restrictions in its degrees of freedom for conformational relaxation within HSA. Interestingly, the spectrum profile displays its maximum at  $\sim 390$  nm, and decays with a lifetime of about 1.3 ns, showing a very similar behavior to that observed in cyclohexane (see Table 1). Accordingly, the excited species detected for GFT@HSA can again be associated with LE singlet states. However, the lower fluorescence quantum yield of the drug within the protein compared with cyclohexane (0.02 vs. 0.19) is worth noting; this decrease can be the result of an electron transfer process to GFT in its excited state from appropriate donors, for instance the only tryptophan (Trp) residue of HSA.<sup>40</sup> A similar process was previously observed for other drug@HSA systems.<sup>41,42</sup> In order to check this possibility, application of the Weller equation,<sup>43</sup> considering the singlet

energy of GFT and the corresponding redox potentials,<sup>37</sup> agrees with an exergonic electron transfer from Trp to the excited drug ( $\Delta G = -18.5$  kcal mol<sup>-1</sup>). As a matter of fact, the feasibility of this process was confirmed experimentally from fluorescence measurements. Thus, decay kinetics of <sup>1</sup>GFT\* was recorded in the non-polar solvent cyclohexane in the presence of increasing amounts of 3-methylindole, the chromophore present in the Trp residue (see Fig. S11 in the ESI<sup>†</sup>); a quenching rate constant of  $\sim 4.3 \times 10^{10}$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> was determined. Therefore, the low  $\phi_F$  observed for gefitinib within HSA can be explained as a result of an electron transfer from Trp to the LE <sup>1</sup>GFT\*.

An interesting point to highlight is the similarity of the emission spectra detected for GFT within HSA and HaCaT cells after selective excitation of the drug at 340 nm. As it can be observed, the emission of the drug in a cellular milieu (see Fig. 7B) was centered at the same position as in the protein ( $\sim 390$  nm), showing a slightly higher quantum yield of about 0.05 (see Table 1). This may suggest that the photobehavior of GFT in the protein environment is similar to what could be expected in cells.

In order to obtain further information about the early processes occurring inside HSA, femtosecond transient absorption measurements were performed upon selective excitation of the protein-bound gefitinib at 330 nm. This resulted in the formation of a single transient band with a maximum at  $\sim 460$  nm (see Fig. 8A), assigned to LE <sup>1</sup>GFT\*. This species decays following a multi-exponential law (see Fig. 8B), which



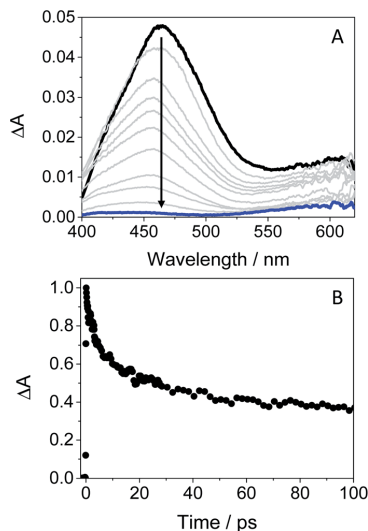


Fig. 8 Femtosecond transient absorption spectra from 0.5 ps (black line) to 2 ns (blue line) (A), and decay trace at 460 nm (B) for GFT@HSA at 1 : 1 molar ratio in aerated PBS at  $\lambda_{\text{exc}} = 330$  nm.

can be associated with parallel processes arising from the drug located in different binding sites of HSA. Thus, the shortest component, of *ca.* 5 ps, can be related to the binding of GFT in a site close to the Trp residue, where the electron transfer process from the amino acid to  $^1\text{GFT}^*$  might take place. By contrast, the longest component, which persists up to the nanosecond time-scale, could correspond to the location of GFT in another site far from Trp, where the electron transfer process cannot occur.

It should be emphasized that  $^3\text{GFT}^*$  was hardly detectable in the protein medium, where the band at  $\sim 600$  nm is marginal. In this regard, nanosecond LFP measurements on GFT@HSA at  $\lambda_{\text{exc}} = 355$  nm indicated a very weak absorption around 600 nm compared with MeCN (see Fig. S12 in the ESI $^\dagger$ ). This may be the result of the LE  $^1\text{GFT}^*$  quenching through electron transfer from the Trp residue of HSA. As stated above, this process might occur in about 5 ps, which is faster than ISC ( $\sim 10$  ps); consequently, the yield of  $^3\text{GFT}^*$  within HSA is greatly decreased. This has clear biological implications, since the photosensitization of GFT in biological media could involve the participation of LE singlet states rather than  $^3\text{GFT}^*$ .

In this context, as the electron transfer process from Trp to  $^1\text{GFT}^*$  has been detected not only in solution but also in the HSA-bound drug, it appeared interesting to evaluate the capability of GFT to induce protein photooxidation, since this process could be the origin of the above mentioned GFT-photosensitized damage occurring in HaCaT cells. To this end, the protein carbonylation method was used, which represents the most frequent irreversible oxidative modification affecting proteins. In this regard, PBS solutions containing HSA and GFT were irradiated at different UVA light doses (5, 10 and

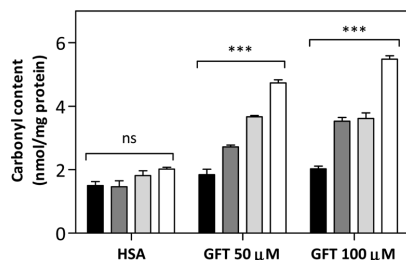
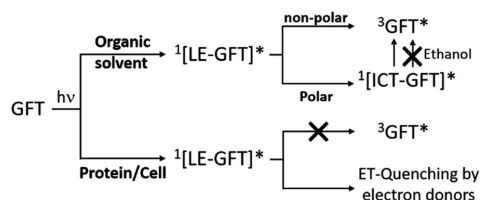


Fig. 9 Protein photooxidation by GFT. Solutions of HSA ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) in the presence or absence of  $50 \mu\text{M}$  or  $100 \mu\text{M}$  of GFT were irradiated at  $5 \text{ J cm}^{-2}$  UVA dose (dark gray bar),  $10 \text{ J cm}^{-2}$  (light gray bar) and  $15 \text{ J cm}^{-2}$  (empty bar) of UVA dose or kept under dark conditions (black bar). The carbonyl content was quantified spectrophotometrically after derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH). Data represent the mean  $\pm$  SD of 4 independent experiments. Asterisks indicate significant differences relative to the carbonyl content in HSA in darkness by the *t*-Student test ( $^*p < 0.05$ ,  $^{**}p < 0.01$ ,  $^{***}p < 0.001$ , ns: non-significant).

$15 \text{ J cm}^{-2}$ ), and the carbonyl content, as an early biomarker of oxidative damage, was quantified using 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH). The results shown in Fig. 9 revealed that GFT promotes a consistent photooxidative effect towards HSA, which agrees with the results obtained from the phototoxicity NRU assay.

Scheme 1 summarizes the main species generated upon excitation of the drug in different media. In all cases, an instantaneous formation of LE  $^1\text{GFT}^*$  is observed. In non-polar solvents, this species emits light at wavelengths around 380 nm within *ca.* 1 ns; in addition, LE  $^1\text{GFT}^*$  undergoes ISC to the triplet excited state ( $\sim 10$  ps), which displays a maximum at *ca.* 600 nm. By contrast, in polar solvents, LE rapidly evolves ( $\sim 1$  ps) towards the formation of ICT states, which emit at longer wavelengths ( $\sim 470$  nm) with much lower yields. In these media,  $^3\text{GFT}^*$  is mainly populated from ICT states; surprisingly, it is formed in very low efficiency in ethanol solution, where conversion of ICT  $^1\text{GFT}^*$  to  $^3\text{GFT}^*$  is thermodynamically disfavored. Finally, in the biological environment, *i.e.* HSA and HaCaT cells, LE  $^1\text{GFT}^*$  is the only detected species; its lifetime is significantly decreased through ET-quenching by electron donors.



Scheme 1 Schematic representation of the main species arising from the excited gefitinib in different environments: non-polar or polar organic solvents, and biological media such as protein or cells.



## Conclusions

The photophysical behavior of GFT has been investigated in solution and in biological environments, from the femtosecond to the microsecond time-scales, whereas the photosensitizing properties of the drug have been studied by means of the NRU and protein carbonylation methods. *In vitro* NRU assay using human keratinocytes (HaCaT) has proven the phototoxic potential of GFT. The main excited species arising from selective irradiation of the drug are the locally excited (LE) and intramolecular charge transfer (ICT) singlet states, as well as the triplet state. In general, the LE singlet is the only emitting species both in organic non-polar solution and in biological media (*i.e.* HSA and HaCaT cells). In the former, intersystem crossing to the triplet excited state of GFT occurs in the picosecond scale. By contrast, in organic polar solvents, LE states rapidly evolve towards the formation of ICT states. This species emits at longer wavelengths and shows higher lifetimes than LE states; they are also able to populate  $^3\text{GFT}^*$  in acetonitrile. Surprisingly, ISC is not observed in ethanol, since ICT states are rapidly deactivated (in about 0.7 ns); however,  $^3\text{GFT}^*$  is generated in this solvent by photosensitization with 2-methoxyacetophenone as an energy donor. In the HSA binding sites, formation of  $^3\text{GFT}^*$  is hardly detected; instead, quenching of its LE singlet precursor by Trp through an electron transfer mechanism is observed. Accordingly, GFT photosensitized oxidation of HSA is demonstrated using the protein carbonylation method. In summary, a good correlation is established between the photophysical behavior and the photobiological properties of GFT, which provides a mechanistic basis for the observed phototoxicity.

## Author contributions

Research was conceived by all authors. Experiments were performed by L. T. and M. O., with the aid of I. A. and I. V. The research was supervised by I. A., I. V. and M. A. M. All authors contributed to the writing of the manuscript and ESI.†

## Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

## Acknowledgements

Financial support from the Spanish Government (RYC-2015-17737, CTQ2017-89416-R, BEAGAL 18/00211, FPU19/00048 and PID2020-115010RB-I00; the Carlos III Institute (ISCIII) of Health, grants: PI16/01877, and CPII16/00052) and Conselleria d'Educació, Cultura i Esport (PROMETEO/2017/075) is gratefully acknowledged.

## References


1 S. R. Hubbard and J. H. Till, *Annu. Rev. Biochem.*, 2000, **69**, 373–398.

- 2 M. J. Wieduwilt and M. M. Moasser, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2008, **65**, 1566–1584.
- 3 R. I. Nicholson, J. M. W. Gee and M. E. Harper, *Eur. J. Cancer*, 2001, **37**, S9–S15.
- 4 L. Huang, S. Jiang and Y. Shi, *J. Hematol. Oncol.*, 2020, **13**, 143.
- 5 J. Mendelsohn and J. Baselga, *Oncogene*, 2000, **19**, 6550–6565.
- 6 C. Pottier, M. Fresnais, M. Gilon, G. Jerusalem, R. Longuespee and N. E. Sounni, *Cancers*, 2020, **12**, 731.
- 7 T. Yamaoka, S. Kusumoto, K. Ando, M. Ohba and T. Ohmori, *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, **19**, 3491.
- 8 N. E. Hynes and H. A. Lane, *Nat. Rev. Cancer*, 2005, **5**, 341–354.
- 9 M. H. Cohen, G. A. Williams, R. Sridhara, G. Chen and R. Pazdur, *Oncologist*, 2003, **8**, 303–306.
- 10 A. Arora and E. M. Scholar, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2005, **315**, 971–979.
- 11 R. J. Cersosimo, *Expert Opin. Drug Saf.*, 2006, **5**, 469–479.
- 12 B. L. Diffey and I. E. Kochevar, in *Photodermatology*, ed. H. W. Lim, H. H. Hönigsmann and J. L. M. Hawk, Informa Healthcare, USA, 1st edn, 2007.
- 13 M. Gonçalo, in *Contact Dermatitis*, ed. J. D. Johansen, Springer-Verlag, Berlin, 2011, ch. 18, pp. 361–376.
- 14 S. Lembo, A. Raimondo, V. Conti and M. Venturini, *Photodermatol., Photoimmunol. Photomed.*, 2020, **36**, 172–178.
- 15 K. R. Stein and N. S. Scheinfeld, *Expert Opin. Drug Saf.*, 2007, **6**, 431–443.
- 16 T. P. Selvam and P. V. Kumar, *Res. Pharm.*, 2011, **1**, 1–21.
- 17 G. García-Láinez, I. Vayá, M. P. Marín, M. A. Miranda and I. Andreu, *Arch. Toxicol.*, 2021, **95**, 169–178.
- 18 I. Vayá, I. Andreu, E. Lence, C. González-Bello, M. C. Cuquerella, M. Navarrete-Miguel, D. Roca-Sanjuan and M. A. Miranda, *Chem.-Eur. J.*, 2020, **26**, 15922–15930.
- 19 I. Andreu, E. Lence, C. Gonzalez-Bello, C. Mayorga, M. C. Cuquerella, I. Vayá and M. A. Miranda, *Front. Pharmacol.*, 2020, **11**, 576495.
- 20 [https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2009/2009062459389/anx\\_59389\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2009/2009062459389/anx_59389_en.pdf).
- 21 T. Peters, in *All About Albumin - Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, ed. Elsevier, Academic Press, San Diego, 1995, ch. 3, pp. 76–132.
- 22 A. R. Svobodova, J. Ulrichova and J. Vostalova, *An. Bras. Dermatol.*, 2019, **94**, 105–106.
- 23 F. Palumbo, G. Garcia-Lainez, D. Limones-Herrero, M. D. Coloma, J. Escobar, M. C. Jimenez, M. A. Miranda and I. Andreu, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2016, **313**, 131–137.
- 24 G. Colombo, M. Clerici, M. E. Garavaglia, D. Giustarini, R. Rossi, A. Milzani and I. Dalle-Donne, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2016, **1019**, 178–190.
- 25 B. J. Trummer, V. Iyer, S. V. Balu-Iyer, R. O'Connor and R. M. Straubinger, *J. Pharm. Sci.*, 2012, **101**, 2763–2776.
- 26 O. Domotor, K. Pelivan, A. Borics, B. K. Keppler, C. R. Kowol and E. A. Enyedy, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2018, **154**, 321–331.









- 27 M. Montalti, A. Credi, L. Prodi and M. T. Gandolfi, *Handbook of Photochemistry*, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, 2006.
- 28 G. Cosa and J. C. Scaiano, *Photochem. Photobiol.*, 2004, **80**, 159–174.
- 29 C. Ruckebusch, M. Sliwa, P. Pernot, A. de Juan and R. Tauler, *J. Photochem. Photobiol., C*, 2012, **13**, 1–27.
- 30 I. Vayá, V. Lhiaubet-Vallet, M. C. Jimenez and M. A. Miranda, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 4102–4122.
- 31 L. J. Martínez and J. C. Scaiano, *Photochem. Photobiol.*, 1998, **68**, 646–651.
- 32 O. R. Alzueta, M. C. Cuquerella and M. A. Miranda, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2019, **218**, 191–195.
- 33 M. J. Davies, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2004, **3**, 17–25.
- 34 M. S. Baptista, J. Cadet, P. Di Mascio, A. A. Ghogare, A. Greer, M. R. Hamblin, C. Lorente, S. C. Nunez, M. S. Ribeiro, A. H. Thomas, M. Vignoni and T. M. Yoshimura, *Photochem. Photobiol.*, 2017, **93**, 912–919.
- 35 C. S. Foote, *Photochem. Photobiol.*, 1991, **54**, 659.
- 36 D. de la Peña, C. Martí, S. Nonell, L. A. Martínez and M. A. Miranda, *Photochem. Photobiol.*, 1997, **65**, 828–832.
- 37 M. J. Davies and R. J. W. Truscott, in *Sun Protection in Man*, ed. P. U. Giacomoni, Elsevier, 2001, ch. 12, pp. 251–275.
- 38 D. I. Pattison, A. S. Rahmanto and M. J. Davies, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2012, **11**, 38–53.
- 39 J. Li, J. Brahmmer, W. Messersmith, M. Hidalgo and S. D. Baker, *Invest. New Drugs*, 2006, **24**, 291–297.
- 40 G. Sudlow, D. J. Birkett and D. N. Wade, *Mol. Pharmacol.*, 1976, **12**, 1052–1061.
- 41 I. Vayá, M. C. Jimenez and M. A. Miranda, *J. Phys. Chem. B*, 2007, **111**, 9363–9371.
- 42 I. Vayá, P. Bonancia, M. C. Jimenez, D. Markovitsi, T. Gustavsson and M. A. Miranda, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 4727–4734.
- 43 A. Z. Weller, *Phys. Chem.*, 1982, **133**, 93–98.



Cite this: *Chem. Sci.*, 2022, 13, 9644 All publication charges for this article have been paid for by the Royal Society of Chemistry

# Switching from ultrafast electron transfer to proton transfer in excited drug–protein complexes upon biotransformation†

Lorena Tamarit, <sup>ab</sup> Meryem El Ouardi, <sup>ab</sup> Emilio Lence, <sup>c</sup> Immaculada Andreu, <sup>ab</sup> Concepción González-Bello, <sup>\*c</sup> Ignacio Vayá <sup>\*ab</sup> and Miguel A. Miranda <sup>\*ab</sup>

Photosensitization by drugs is directly related with the excited species and the photoinduced processes arising from interaction with UVA light. In this context, the ability of gefitinib (GFT), a tyrosine kinase inhibitor (TKI) used for the treatment of a variety of cancers, to induce phototoxicity and photooxidation of proteins has recently been demonstrated. In principle, photodamage can be generated not only by a given drug but also by its photoactive metabolites that maintain the relevant chromophore. In the present work, a complete study of *O*-desmorpholinopropyl gefitinib (GFT-MB) has been performed by means of fluorescence and ultrafast transient absorption spectroscopies, in addition to molecular dynamics (MD) simulations. The photobehavior of the GFT-MB metabolite in solution is similar to that of GFT. However, when the drug or its metabolite are in a constrained environment, *i.e.* within a protein, their behavior and the photoinduced processes that arise from their interaction with UVA light are completely different. For GFT in complex with human serum albumin (HSA), locally excited (LE) singlet states are mainly formed; these species undergo photoinduced electron transfer with Tyr and Trp. By contrast, since GFT-MB is a phenol, excited state proton transfer (ESPT) to form phenolate-like excited species might become an alternative deactivation pathway. As a matter of fact, the protein-bound metabolite exhibits higher fluorescence yields and longer emission wavelengths and lifetimes than GFT@HSA. Ultrafast transient absorption measurements support direct ESPT deprotonation of LE states (rather than ICT), to form phenolate-like species. This is explained by MD simulations, which reveal a close interaction between the phenolic OH group of GFT-MB and Val116 within site 3 (subdomain IB) of HSA. The reported findings are relevant to understand the photosensitizing properties of TKIs and the role of biotransformation in this type of adverse side effects.

Received 10th June 2022  
Accepted 2nd August 2022DOI: 10.1039/d2sc03257k  
rsc.li/chemical-science

## Introduction

The photosensitizing potential of a drug is directly related with the excited species that can be formed upon its interaction with UVA light. In this regard, photo(geno)toxicity or photoallergy are associated with damage to biomolecules such as proteins, lipids or DNA caused by radicals or reactive oxygen species (ROS), which can be generated from excited singlet or triplet states.<sup>1–3</sup> Therefore, investigation of the transient species of an

excited drug in different media is crucial to better understand the mechanism leading to photodamage, since either their yields of formation, spectral profile and kinetic evolution may be strongly affected by the surroundings. To this end, fluorescence and transient absorption spectroscopies are suitable techniques that allow studying in depth the photophysical properties of a drug, in addition to getting a better understanding of fundamental photoinduced processes such as energy or electron transfer, charge separation, proton transfer, *etc.*<sup>4</sup>

In this context, gefitinib (GFT) is a tyrosine kinase inhibitor (TKI) clinically used for the treatment of different types of cancer, including lung cancer and locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer.<sup>5,6</sup> The mechanism of action of this drug involves targeting the ATP binding pocket of the epidermal growth factor receptor to block its kinase activity preventing autophosphorylation.<sup>7–11</sup> The photosensitizing potential of GFT has recently been demonstrated by *in vitro* neutral red uptake (NRU) assays and protein photooxidation.<sup>12</sup> This drug is administered orally, and the main route of its

<sup>a</sup>Departamento de Química/Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain. E-mail: mmiranda@qim.upv.es; igvapre@qim.upv.es

<sup>b</sup>Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Avenida de Fernando Abril Martorell 106, 46026 Valencia, Spain

<sup>c</sup>Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CiQUS), Departamento de Química Orgánica, Universidade de Santiago de Compostela, Jenaro de la Fuente s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain. E-mail: concepcion.gonzalez.bello@usc.es

† Electronic supplementary information (ESI) available. See <https://doi.org/10.1039/d2sc03257k>





elimination is through hepatic metabolism *via* CYP3A4 and biliary excretion.<sup>13</sup> One of its metabolites is shown in Fig. 1: *O*-desmorpholinopropyl gefitinib (GFT-MB). As it can be observed, both the drug and its metabolite maintain the quinazoline moiety in its structure; drugs containing this chromophore are known to induce photodermatitis.<sup>14</sup> Besides, the ability of other TKIs to mediate photodamage has also been proven with lapatinib (LAP),<sup>15</sup> a drug currently used for the treatment of lung and breast cancer. Interestingly, not only LAP is phototoxic and photogenotoxic, but also one of its photoactive metabolites, the *N*-dealkylated derivative (*N*-LAP).

Previous studies on the photobehavior of LAP and its metabolites by means of spectroscopic techniques have shown that their photophysical properties are strongly medium-dependent.<sup>16,17</sup> A similar result was recently obtained for the parent drug GFT.<sup>12</sup> Thus, excitation of these anticancer drugs in organic non-polar solvents or in biological media leads to the formation of locally excited (LE) singlet states. By contrast, in organic polar solvents LE states rapidly evolve to the formation of longer-lived intramolecular charge transfer (ICT) singlet states. Actually, LE species have been proposed to be responsible for the photoinduced biological damage mediated by GFT, LAP and its metabolite *N*-LAP.<sup>12,15</sup>

With this background, the aim of the present work is to compare the photobehavior of GFT with that of GFT-MB in solution and in the presence of human serum albumin (HSA)<sup>18</sup> using fluorescence and transient absorption spectroscopies, from the femtosecond to the microsecond time-scales. Besides, molecular dynamics (MD) simulations have been used to investigate in atomic detail the binding of this drug and its metabolite to the protein, in order to achieve a better understanding of the experimental results.<sup>19</sup> In this context, MD simulation has proven to be a powerful tool for studying the strength and characteristics of the interactions of a drug with the amino acids of the protein binding sites.<sup>16,20</sup> All these features are relevant as they can be directly connected with the photosensitizing properties of GFT and its metabolite.

## Experimental

### Chemicals and reagents

Gefitinib (GFT) was purchased from Quimigen. *O*-Desmorpholinopropyl gefitinib (GFT-MB) was purchased from Fluorochem. *N*-Acetyl-*L*-tyrosine methyl ester (NAc-TyrMe), *N*-acetyl-*L*-tryptophan methyl ester (NAc-TrpMe), anthracene, 3-methylindole, ibuprofen, warfarin and human serum albumin (HSA) were

purchased from Sigma-Aldrich. PBS buffer was prepared by dissolving phosphate-buffered saline tablets (Sigma) using ultrapure water from a Millipore (Milli-Q Synthesis) system. Spectrophotometric HPLC solvents were obtained from Scharlab and used without further purification.

### Spectroscopic measurements

Steady-state absorption spectra were recorded in a JASCO V-760 spectrophotometer. Steady-state fluorescence spectra were obtained using a JASCO spectrofluorometer system provided with a monochromator in the wavelength range 200–900 nm, with an excitation wavelength of 340 nm at 25 °C. Measurements on ligand@protein complexes were performed of 1 : 1 molar ratio mixtures at 10 μM in aerated PBS. The absorbance of the samples at the excitation wavelength was kept below 0.1. Phosphorescence measurements were performed in a Photon Technology International (PTI, TimeMaster TM-2/2003) spectrophotometer equipped with a pulsed Xe lamp, operating in a time-resolved mode with a delay time of 0.5 ms. The sample was dissolved in ethanol, introduced in a quartz tube of 5 mm of diameter and cooled with liquid nitrogen (77 K).

Time-resolved fluorescence measurements were done using an EasyLife X system containing a sample compartment composed of an automated Peltier cuvette holder to control the temperature at 24 °C, a pulsed LED excitation source and a lifetime detector. The employed LED excitation source was 340 nm, with emission filter of WG370.

Laser flash photolysis (LFP) measurements were performed using a pulsed Nd:YAG L52137 V LOTIS TII at the excitation wavelength of 355 nm. The single pulses were *ca.* 10 ns duration, and the energy was ~12 mJ per pulse. The laser flash photolysis system consisted of the pulsed laser, a 77250 Oriol monochromator and an oscilloscope DP04054 Tektronix. The output signal from the oscilloscope was transferred to a personal computer. Absorbances of all solutions were adjusted at ~0.20 at 355 nm. All UV, fluorescence and LFP measurements were recorded using 10 × 10 mm<sup>2</sup> quartz cuvettes at room temperature in deaerated conditions (25 min N<sub>2</sub> bubbling), or in the case of the protein complexes in aerated atmosphere. Control experiments indicated that the degree of decomposition of the samples after photolysis was lower than 5%.

Femtosecond transient absorption experiments were performed using a typical pump-probe system. The femtosecond pulses were generated with a compact regenerative amplifier that produces pulses centered at 800 nm ( $\tau_{\text{pulse}} \sim 100$  fs, 1 mJ per pulse). The output of the laser was split into two parts to generate the pump and the probe beams. Thus, tunable femtosecond pump pulses were obtained by directing the 800 nm light into an optical parametric amplifier. In the present case, the pump was set at 330 nm and passed through a chopper prior to focus onto a rotating cell (1 mm optical path) containing the samples in organic or aqueous solution. The white light used as probe was produced after part of the 800 nm light from the amplifier travelled through a computer controlled 8 ns variable optical delay line and impinge on a CaF<sub>2</sub> rotating

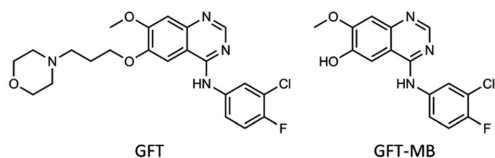


Fig. 1 Chemical structure of gefitinib (GFT) and its *O*-desmorpholinopropyl metabolite GFT-MB.



crystal. This white light was in turn split in two identical portions to generate reference and probe beams that then are focused on the rotating cell containing the sample. The pump and the probe were made to coincide to interrogate the sample. The power of the pump beam was set to 180  $\mu$ W. Under these conditions, the degree of photodegradation of the samples was lower than 5%. A computer-controlled imaging spectrometer was placed after this path to measure the probe and the reference pulses to obtain the transient absorption decays/spectra. The experimental data were treated and compensated by the chirp using the ExciPro program.

### Molecular docking

These calculations were performed using GOLD program version 2020.2.0,<sup>21</sup> and the protein coordinates were taken from the crystal structure of HSA in complex with hemin and myristic acid (PDB entry 1O9X).<sup>22</sup> The experimental procedure was similar to that described for LAP, *N*-LAP and *O*-LAP in HSA.<sup>17</sup>

### Molecular dynamics simulation studies

The highest score solution obtained by docking was subjected to 100 ns of dynamic simulation. The experimental protocol involved: (i) the minimization of the ligands (GFT, GFT-MB); (ii) the generation and minimization of the binary GFT@HSA and GFT-MB@HSA complexes using the poses obtained by docking; and (iii) simulations of the resulting minimized ligand@HSA complexes. The protocol was performed as described for LAP, *N*-LAP and *O*-LAP in HSA.<sup>17</sup> The cpptraj module in AMBER 17 was used to analyze the trajectories and to calculate the rmsd of the protein and the ligand during the simulation.<sup>23</sup> The molecular graphics program PyMOL<sup>24</sup> was employed for visualization and depicting enzyme structures. For figures related to HSA, the amino acid numbering described in PDB entry 1O9X was employed.

### Binding free energies

The binding free energy for GFT and GFT-MB was calculated by the MM/PBSA approach as implemented in Amber.<sup>25</sup> The ante-MMPBSA.py module was used to create topology files for the complexes, protein and ligands, while the binding free energies were calculated with the MMPBSA.py module. Only the last 80 ns of the 100 ns MD trajectories were used to calculate binding free energies. The Poisson–Boltzmann (PB) and generalized Born (GB) implicit solvation models were employed. Both models provided similar results.

## Results and discussion

In view of the photosensitizing potential recently demonstrated for GFT,<sup>12</sup> which is assumed to arise from the excited species formed upon interaction with UVA light, it seemed relevant to study the photophysical properties of GFT-MB, since this metabolite maintains the quinazoline moiety and is structurally similar to the parent drug. To this end, the species formed after excitation of GFT-MB with UVA light were first explored in organic solvents of different polarities by

means of fluorescence and ultrafast transient absorption spectroscopies.

The UV absorption spectra of GFT-MB hardly changed with the polarity of the organic solvent, while the fluorescence properties (Table 1 and Fig. 2) were strongly affected. This behavior is similar to that previously observed for GFT.<sup>12</sup> Accordingly, a similar interpretation can be done for the metabolite and its parent drug: emission from intramolecular charge transfer (ICT) states is detected in polar solvents such as acetonitrile, while locally excited (LE) states are formed in the non-polar ones, *i.e.* cyclohexane. The latter emit at shorter wavelengths and display higher yields ( $\phi_F$ ) than ICT states. In addition, the fluorescence lifetimes ( $\tau_F$ ) were found to be much shorter for LE (*ca.* 1.2 ns) than for ICT states ( $\sim$ 3 ns).

In order to investigate the formation of LE and ICT states in more detail, femtosecond transient absorption experiments were performed for GFT-MB in acetonitrile. This is a very sensitive and precise technique that allows investigating processes occurring at the very early steps after excitation, such as photoinduced energy and electron transfer, charge separation, photoinduced proton transfer and intersystem crossing (ISC).<sup>27</sup> Hence, excitation of GFT-MB at 330 nm in acetonitrile gave rise to the instantaneous formation of a band centered at 480 nm (Fig. 3A, black line). In line with the behavior previously observed for GFT,<sup>12</sup> this species was assigned to LE states, which rapidly evolved towards the formation of a band with maximum at  $\sim$ 435 nm (Fig. 3A, dark gray line), associated to ICT states. This process took place in *ca.* 2.4 ps: as it can be deduced from the kinetic traces of Fig. 3B, the decay at 480 nm (black line) is directly associated with the formation of the trace at 435 nm (dark gray line). Once ICT states were formed, they disappeared in a temporal scale reaching the nanosecond time profile. These results are in line with the observations from the fluorescence experiments. Finally, it is worth to mention that a new absorption band displaying a maximum  $\sim$ 610 nm (blue line), remained in the ns timescale; this species was assigned to the triplet–triplet absorption of GFT-MB ( $^3$ GFT-MB\*).

As  $^3$ GFT-MB\* was detected from ultrafast transient absorption spectroscopy, and triplet species normally survive up to the microsecond time scale, it seemed relevant to use the laser flash photolysis (LFP) technique to study in more detail not only their

Table 1 Fluorescence properties ( $\lambda_{exc} = 340$  nm) of GFT-MB in organic solvents of different polarity and within HSA, compared with those of GFT

	GFT <sup>a</sup>			GFT-MB		
	$\lambda_{max}/nm$	$\phi_F^b$	$\tau_F/ns$	$\lambda_{max}/nm$	$\phi_F^b$	$\tau_F/ns$
MeCN	473	0.05	3.4	468	0.03	3.2
1,4-Dioxane	458	0.09	2.5	456	0.08	3.1
Toluene	421	0.18	2.6	442	0.14	2.9
Cyclohexane	378	0.19	1.3	375 <sup>c</sup>	0.16 <sup>c</sup>	1.2 <sup>c</sup>
HSA	390	0.02	1.3	432	0.15	2.5

<sup>a</sup> Data from ref. 12. <sup>b</sup>  $\phi_F$  were determined using anthracene in ethanol as ref. 26. <sup>c</sup> Due to solubility requirements, 10% of toluene was needed to solubilize GFT-MB in cyclohexane.





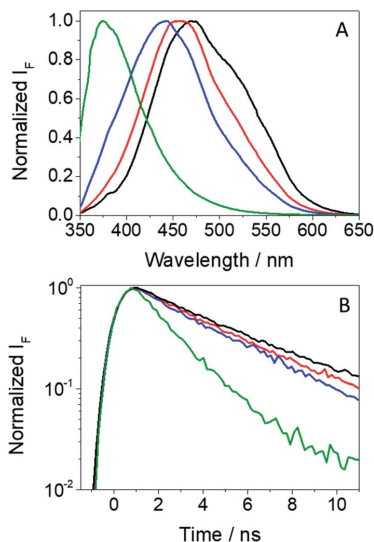


Fig. 2 Normalized fluorescence spectra (A) and decay traces (B) for GFT-MB in acetonitrile (black), 1,4-dioxane (red), toluene (blue) and cyclohexane (green) after excitation at 340 nm.

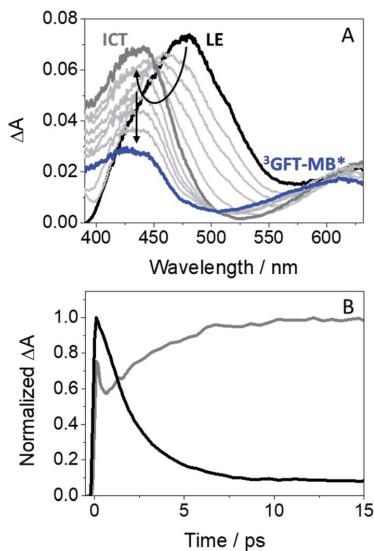


Fig. 3 (A) Femtosecond transient absorption spectra from 0.5 ps (black) to 2 ns (blue) for GFT-MB. (B) Kinetic traces monitored at 480 (black) and 435 nm (dark gray). Measurements were performed in acetonitrile after excitation at 330 nm.

formation but also the reactive species that may arise from triplets, *i.e.* radicals and/or ROS,<sup>28</sup> since they can be responsible for the photosensitized damage to biomolecules (lipids,

proteins or DNA).<sup>1-3</sup> In this context, it is known that light-absorbing drugs are able to induce photodamage to biomolecules through two different mechanisms: type I, involving formation of radicals *via* electron transfer and/or hydrogen abstraction, or type II mechanism occurring through energy transfer from the excited drug to molecular oxygen, yielding formation of the highly reactive singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) species.<sup>29,30</sup>

The main transients arising from excitation of GFT-MB in deaerated MeCN upon LFP at  $\lambda_{\text{exc}} = 355$  nm are shown in Fig. 4A. In agreement with previous observations from the parent drug GFT, triplets were the main excited species detected for the metabolite. Hence,  $^3\text{GFT-MB}^*$  displayed a maximum absorption band at *ca.* 600 nm, which disappeared in about 1.3  $\mu\text{s}$ . A similar trend was also observed in the less polar solvent toluene (Fig. 4B), but displaying slightly higher triplet yields and decaying with similar lifetimes as in MeCN. The energy value of  $^3\text{GFT-MB}^*$ , determined from the phosphorescence spectra in a solid matrix of ethanol at 77 K (Fig. S1†), was 67 kcal mol<sup>-1</sup>, similar to that of GFT (69 kcal mol<sup>-1</sup>).<sup>12</sup>

As stated above, from a photobiological point of view, formation of triplet excited species is important since they can induce a cascade of reactions that could finally result in damage to biomolecules (*e.g.* proteins). In this regard, since a type I mechanism may operate in the photobiological damage, the ability of both the drug and its metabolite to photoinduce formation of radical species was also investigated in the presence of tyrosine (Tyr) and tryptophan (Trp). These are key amino acids located in different binding sites of transport proteins, which play a significant role in drug@protein interactions.<sup>31</sup> In

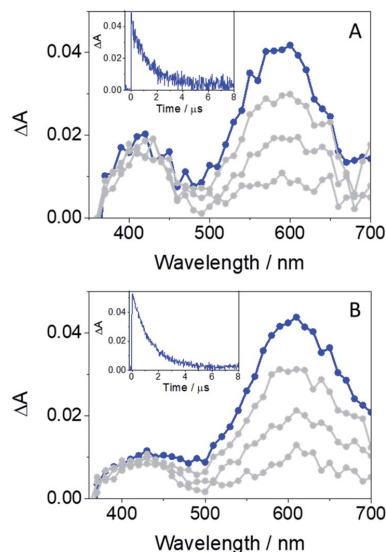


Fig. 4 LFP spectra (from 0.2 to 3  $\mu\text{s}$ ) and decay traces at 600 nm for GFT-MB in MeCN (A) and toluene (B) under deaerated conditions after excitation at 355 nm.



order to check this possibility, application of the Weller equation,<sup>32</sup> considering the triplet energy of the drug (or metabolite) and the redox potentials of model compounds such as quinoxaline, phenol and 3-methylindole,<sup>26,33</sup> agrees with an exergonic electron transfer from the amino acid to the excited drug ( $\Delta G$  ca.  $-6$  kcal mol<sup>-1</sup> for Tyr, and  $\Delta G$  ca.  $-4$  kcal mol<sup>-1</sup> for Trp). As the energies of the singlet excited states are markedly higher, the electron transfer from these states would be even more favorable. In fact, the feasibility of this process was confirmed experimentally as explained below.

Laser flash photolysis measurements at  $\lambda_{\text{exc}} = 355$  nm were performed in deaerated MeCN on mixtures containing the drug (or its metabolite) and increasing amounts of the corresponding amino acid (due to solubility requirements, the *N*-acetyl methyl ester amino acid derivatives, namely NAc-TyrMe or NAc-TrpMe, were used). Thus, selective excitation of GFT in the presence of Tyr or Trp induced deactivation of its triplet excited state with  $\lambda_{\text{max}} \sim 600$  nm (Fig. S2†); quenching rate constants ( $k_{\text{Q}}$ ) of ca.  $1.4 \times 10^8$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> and  $1.5 \times 10^7$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> were determined for Tyr and Trp, respectively. This quenching is attributed to a photoinduced electron transfer (PET) process, since energy transfer from the excited drug to the amino acid is energetically disfavored, as the triplet energies of Tyr and Trp (82 and 71 kcal mol<sup>-1</sup>, respectively)<sup>26</sup> are higher than that of GFT (69 kcal mol<sup>-1</sup>). Interestingly, formation of the Tyr radical at  $\sim 400$  nm (ref. 34) was detected for GFT/Tyr mixtures (Fig. 5). PET processes have previously been observed for other drug/Tyr and drug/Trp systems.<sup>35</sup>

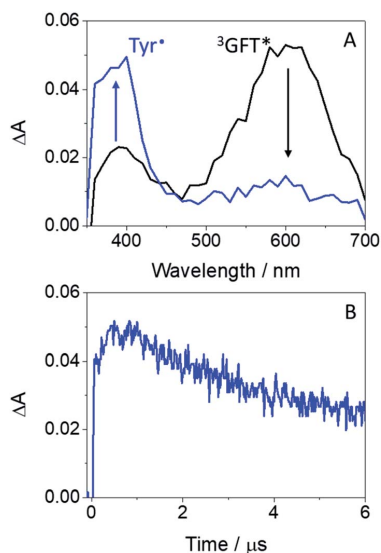


Fig. 5 (A) LFP spectra monitored 0.08  $\mu\text{s}$  after the laser pulse for GFT (black) and a mixture of GFT/NAc-TyrMe in a molar ratio of 1 : 200 (blue); the concentration of GFT was 120  $\mu\text{M}$ . (B) Kinetic trace at 400 nm. Measurements were performed in deaerated MeCN after excitation at 355 nm.

A similar behavior was observed for GFT-MB. Hence, quenching of its triplet excited state was observed upon addition of increasing amounts of the Tyr and Trp derivatives. In this case,  $k_{\text{Q}}$  values of ca.  $6.0 \times 10^7$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> and  $2.5 \times 10^8$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> were determined, respectively. Again, as shown above for GFT, formation of the Tyr radical was also detected (Fig. S3†). As stated above, electron transfer processes can also occur from singlet excited states. In fact, this was previously observed for <sup>1</sup>GFT\* in toluene in the presence of increasing amounts of 3-methylindole, the chromophore of the Trp residue; a  $k_{\text{Q}}$  value of  $\sim 4.3 \times 10^{10}$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> was determined.<sup>12</sup> A similar result has also been obtained here using NAc-TyrMe (Fig. S4A†), with a quenching rate constant of ca.  $6.3 \times 10^9$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. As expected, quenching of <sup>1</sup>GFT-MB\* through electron transfer from 3-methylindole or NAc-TyrMe takes actually place, displaying  $k_{\text{Q}}$  values of ca.  $8.7 \times 10^9$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> and  $5.8 \times 10^9$  M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (Fig. S4B and C†), respectively, which are slightly lower than those observed for <sup>1</sup>GFT\*.

So far, the results have only been discussed in organic solvents, where both GFT and GFT-MB are in their neutral forms. However, the scenario may change in aqueous solution, since the quinoxaline and morpholine moieties can be protonated at sufficiently low pH; moreover, in the case of the metabolite, the -OH group can be deprotonated leading to phenolate-like species. In this context, the  $\text{p}K_{\text{a}}$  values for the quinoxaline moiety and the morpholine side chain of GFT are 5.4 and 7.2, respectively.<sup>36</sup> By contrast, for the main chromophore of GFT-MB, 6-hydroxyquinoxaline, these values are 3.2 and 8.2, which are associated with deprotonation of the quinoxaline moiety and the -OH group, respectively.<sup>37</sup> In view of the above  $\text{p}K_{\text{a}}$  values, GFT should be fully protonated at pH 2. However, at physiological pH 7.4, the protonated amino group of the morpholine moiety should be in equilibrium with its neutral form while the quinoxaline moiety should be deprotonated. Besides, in basic media GFT would be fully deprotonated, and its absorption band at ca. 330 nm peaks at lower wavelengths compared with the acidic medium (Fig. S5A†). As regards GFT-MB, it should also be fully protonated at pH 2, while at physiological pH its neutral form would predominate. By contrast, at basic pH the metabolite starts to deprotonate to form phenolate-like species, whose UV absorption band appears at longer wavelengths (Fig. S5B†).

Considering the capability of both the drug and its metabolite to participate in photoinduced electron transfer with Tyr and Trp, which could finally result in damage to biomolecules, it seemed appropriate to investigate their interactions with human serum albumin (HSA) in aqueous PBS solution. This is the most abundant protein in human plasma, and it is responsible for a number of relevant processes including transport of endogenous and exogenous agents (e.g. drugs, metabolites, fatty acids, etc.) for their selective delivery to specific targets.<sup>38</sup> In this regard, the binding of drugs to transport proteins is important since it regulates drug solubility in plasma, susceptibility to oxidation, toxicity and *in vivo* half-life.<sup>31</sup>

The stoichiometry of the protein-bound drug or metabolite has been determined by means of Job's plot analysis,<sup>39</sup> which



provides evidence for the formation of a 1 : 1 complex; this has been further confirmed by MD simulations, where only a single molecule of GFT (or GFT-MB) can bind within HSA (Fig. S6†).

The photophysical properties of GFT interacting with HSA have been recently investigated.<sup>12</sup> In this case, emission from LE singlet states ( $LE^1GFT^*$ ) with  $\lambda_{\max} \sim 390$  nm is predominantly observed. However, the photobehavior of GFT-MB bound to HSA remains unexplored. Thus, fluorescence and transient absorption spectroscopies were used to study in detail the photobehavior of the protein-bound metabolite upon its selective excitation with UVA light ( $\lambda_{\text{exc}} = 340$  nm); this excitation wavelength is relevant from a photobiological point of view since HSA does not absorb light at 340 nm and, therefore, the photoinduced processes would only arise from the excited metabolite.

The fluorescence spectra of GFT@HSA and GFT-MB@HSA are compared in Fig. 6. Emission from the drug or the metabolite free in solution is almost negligible; however, it is strongly enhanced within the protein cavities as a result of the higher restrictions in their degrees of freedom for conformational relaxation. Interestingly, this effect is more important for GFT-MB@HSA, which displays a much higher  $\phi_F$  value than GFT@HSA ( $\sim 0.15$  vs.  $\sim 0.02$ , respectively; Table 1). The strength and preferential site of interaction for GFT-MB within HSA has been studied using displacement probes for site 1 (warfarin, WRF),<sup>40</sup> site 2 (ibuprofen, IBP).<sup>41</sup> In the case of GFT, it was

previously reported that it interacts with site 3 of HSA with a binding constant ( $k_a$ ) of  $1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ .<sup>42</sup> Under physiological conditions, *ca.* 97% of GFT is bound to plasma proteins, namely HSA.<sup>43</sup> For GFT-MB@HSA at 1 : 1 molar ratio, addition of IBP or WRF did not result in its displacement from the binding site; instead, a slight fluorescence enhancement was observed due to an allosteric effect. By contrast, addition of GFT induced a clear displacement of the metabolite from its binding site (Fig. S7†). These results are consistent with site 3 as the preferred site for GFT-MB@HSA, with a binding constant in the order of that of GFT@HSA. This was further confirmed by theoretical studies. The binding free energies of GFT and GFT-MB to site 3 of HSA were calculated using the MM/PBSA method in explicit water (generalized Born, GB) as implemented in Amber.<sup>25</sup> The affinity of GFT-MB to HSA proved to be slightly weaker ( $13.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) than that of the parent drug.

An interesting point to discuss is the bathochromic shift of the emission band of the protein-bound metabolite ( $\lambda_{\max} \sim 432$  nm) compared with that of GFT@HSA ( $\lambda_{\max} \sim 390$  nm, Fig. 6B), whose emission arises from LE states. These results point to the occurrence of different photoinduced processes for the drug and the metabolite within HSA upon interaction with UV light. In this context, and as stated above, photoinduced electron transfer from electron donors (Tyr and/or Trp) to the excited drug might occur in GFT@HSA, which explains its low fluorescence yield.<sup>12</sup> By contrast, since the metabolite is a phenol, although electron transfer might also occur, as it has been observed for GFT-MB/Tyr (or Trp) mixtures in organic solvent, excited state proton transfer (ESPT) to form phenolate-like excited species might be a competitive process within the protein; these species are known to absorb and emit at wavelengths longer than phenols.<sup>44–46</sup> In this regard, not only emission from GFT-MB@HSA was shifted to longer wavelengths, but also its absorption spectrum revealed a red-shifted shoulder at *ca.* 375 nm compared to GFT-MB in the bulk aqueous solution (Fig. 7A). In fact, the UV absorption spectra of GFT@HSA was hardly affected for aqueous solutions with pH above 6, in contrast to what was observed for GFT-MB@HSA, whose maximum shifted progressively towards longer wavelengths at increasing pH (Fig. S8†). This strongly suggests that phenolate-like species predominate in the GFT-MB@HSA complex; indeed, the shoulder at *ca.* 375 nm became more important at low GFT-MB/HSA ratios, supporting the prevalence of phenolate species within the protein (Fig. S9†). As it can be anticipated, this effect was not observed for GFT@HSA, since ESPT is not possible (Fig. 7B and S9A†). In this connection, fluorescence of GFT in the bulk solution was negligibly affected by the pH, while it was increased only slightly within HSA in aqueous solutions from pH 6 to 10 (Fig. S10A and C†); this is probably associated with the protonation–deprotonation equilibrium of the morpholine's nitrogen. By contrast, emission from GFT-MB was highly affected by the pH; this effect was even greater in the presence of HSA (Fig. S10B and D†), which is related with the formation of phenolate-like species within the protein. The small differences in the fluorescence maxima for GFT-MB in the bulk basic solution or within HSA (inset in Fig. 6B) arise from

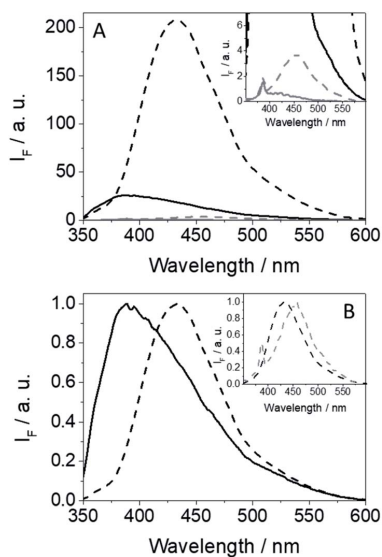


Fig. 6 Fluorescence spectra (A) and normalized spectra (B) for GFT (gray line), GFT-MB (dashed gray line), GFT@HSA (black line) and GFT-MB@HSA (black dashed line) after excitation at 340 nm in aqueous PBS under air. For the protein complexes, mixtures were at 1 : 1 ligand@HSA molar ratio, using isoabsorptive solutions at the excitation wavelength. The inset in (A) shows a zoom of the weakly emitting species, while in (B) shows the normalized fluorescence spectra for GFT-MB@HSA and GFT-MB in PBS.



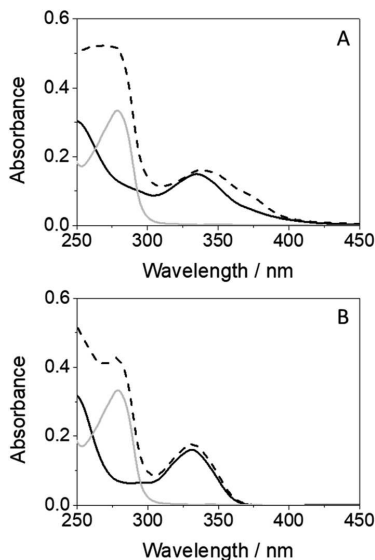


Fig. 7 (A) Absorption spectra for GFT-MB (black line), HSA (gray line) and GFT-MB@HSA (dashed black line). (B) Absorption spectra for GFT (black line), HSA (gray line) and GFT@HSA (dashed black line). All solutions were prepared at 10  $\mu$ M in aqueous PBS. For the protein complexes, mixtures were at 1 : 1 ligand@HSA molar ratio.

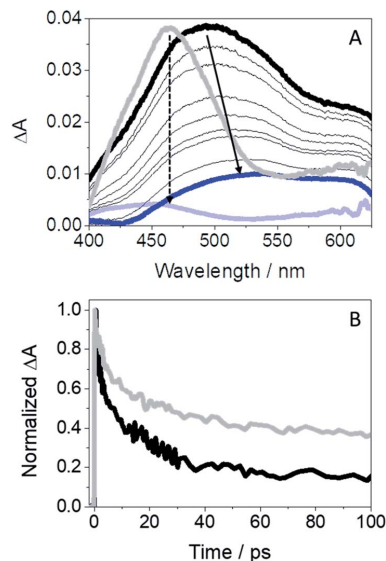


Fig. 8 (A) Femtosecond transient absorption spectra from 1 ps (black) to 0.5 ns (blue) for GFT-MB@HSA; the absorption spectra of GFT@HSA<sup>12</sup> from 1 ps (light gray) to 1 ns (light blue) is also shown for comparison. (B) Kinetic traces for GFT-MB@HSA at 500 nm (black) and for GFT@HSA at 460 nm (light gray) after excitation at 330 nm of a 1 : 1 molar ratio ligand@protein complexes in aerated aqueous PBS solution.

the constrained environment provided by the protein, but in both cases this emission is associated to phenolate-like species.

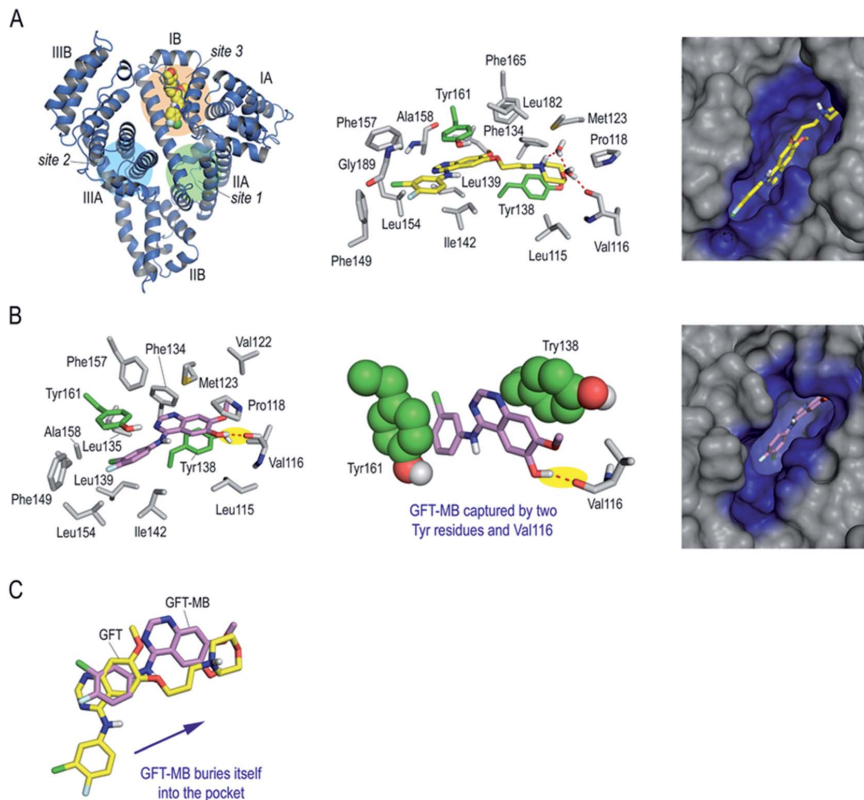
The high  $\phi_F$  value for GFT-MB@HSA may have implications in connection with its photosensitizing potential. Accordingly, fluorescence for the protein-bound metabolite decays at times longer than that observed for GFT@HSA (2.8 vs. 0.8 ns, respectively; Fig. S11<sup>†</sup>).

Since diverging photoinduced processes may arise from GFT@HSA or GFT-MB@HSA, *i.e.* electron or proton transfer, respectively, it seemed appropriate to study the photobehavior of the protein-bound metabolite by means of ultrafast spectroscopy upon excitation with UVA light ( $\lambda_{exc} = 330$  nm). Thus, the transient absorption spectra for GFT-MB@HSA from 1 ps to 0.5 ns are shown in Fig. 8A. For comparison, the spectra of GFT@HSA have also been included; in the latter case, formation of a single transient with maximum at 460 nm is assigned to LE <sup>1</sup>GFT\* states. It decays following a multi-exponential law (Fig. 8B); the shortest component is associated to electron transfer from appropriate donors to gefitinib.<sup>12</sup> By contrast, a broad absorption band (410–600 nm) centered at  $\sim$ 500 nm was instantaneously formed for GFT-MB@HSA. We assign this species to phenol-like LE <sup>1</sup>GFT-MB\* states. The absorption maximum shifted over time to longer wavelengths (from 500 to *ca.* 530 nm). This process can be related to intermolecular ESPT from LE <sup>1</sup>GFT-MB to a proper acceptor located in the protein cavity to form phenolate-like excited species. Such assignment is consistent with the ultrafast transient absorption spectra previously observed for phenolate anions.<sup>47</sup> The kinetic trace for

GFT-MB@HSA can be satisfactorily fitted using a multi-exponential function; the shortest component, on the ps time scale, is associated to the proton transfer process, while the longer one, on the ns scale, is assigned to the decay of the phenolate-like excited species. This agrees with the UV and steady-state fluorescence results, where a bathochromic shift is observed. It is worth to mention that <sup>3</sup>GFT-MB\* was practically not observed in the protein medium, since the signal at *ca.* 600 nm is insignificant; this species was not even detected at longer time scales by means of LFP measurements (Fig. S12<sup>†</sup>). This result agrees with the formation of phenolate-like species within HSA, which hinders the formation of triplet excited species through ISC.

Finally, to get an insight in atomic detail into the ligand@protein interactions responsible for the photophysical properties experimentally observed, the binding mode of GFT and GFT-MB to HSA was explored by molecular docking using the GOLD program version 2020.2.0 (ref. 21) and further studied by molecular dynamics (MD) simulation studies. It should be noted that HSA is a large protein (60 kDa) that contains three main domains, namely I (residues 1–195), II (196–383) and III (384–585) (Fig. 9A). Each domain is divided into two sub-domains, namely A and B, with different recognition patterns, which explains the huge capacity of this protein to transport a large variety of endogenous and exogenous compounds.<sup>48</sup> HSA employs three main binding sites for recognition: site 1





**Fig. 9** Binding mode of GFT and GFT-MB with subdomain IB (site 3) of HSA obtained by MD simulation studies. (A) Overall and detailed views of GFT (yellow) binding mode. Snapshot after 100 ns is shown. Protein subdomains and main binding sites 1–3 of HSA are labelled and highlighted in the overall view. (B) Detailed view of GFT-MB (violet) binding mode. Snapshot after 90 ns is shown. Note how GFT-MB is anchored in the pocket thanks to a strong hydrogen bonding interaction with Val116 (yellow shadow) and a double  $\pi$ - $\pi$  stacking interaction with two tyrosine residues (green spheres), which are located on both sides of the aromatic ring. (C) Superposition of the arrangements of GFT and GFT-MB with subdomain IB of HSA. Note the different arrangements of GFT and GFT-MB, which is more buried in the pocket. Hydrogen bonding interactions between the ligands and the protein are shown as red dashed lines. Relevant side chain residues are shown and labelled. The tyrosine residues Tyr161 and Tyr138 are highlighted in green color.

(subdomain IIA), site 2 (subdomain IIIA) and site 3 (subdomain IB). Based on the structural similarity of the basic core of GFT (*N*-phenylquinazolin-4-amine moiety) with lapatinib, which was reported to bind to site 3,<sup>17</sup> this region was selected for docking. The protein coordinates found in the crystal structure of HSA in complex with hemin (PDB entry 1O9X),<sup>22</sup> which also binds to subdomain IB, was used for these studies. The GFT@HSA and GFT-MB@HSA complexes obtained by docking were immersed in a truncated octahedron box of water molecules and then subjected to 100 ns of dynamic simulation for validation using the molecular mechanics force field AMBER ff14SB and GAFF.<sup>49,50</sup>

The results of these MD simulation studies revealed the significant differences in the binding mode of GFT and GFT-MB with HSA (Fig. 9A vs. Fig. 9B). For GFT@HSA, the existence of a flexible side chain with a terminal morpholine group

determines the arrangement of the compounds within the pocket. Thus, the most relevant interaction with the protein is the hydrogen bond between the quaternary amino group in its morpholine moiety and the side chain residues in the vicinity (Val116, Asp183), mainly through a network of water molecules (Fig. 9A). In this case, no direct polar contacts with protein residues were observed. Although the side chain of GFT is flexible and some motion is observed, the position of the quinazoline moiety is frozen within the pocket. Thus, the analysis of the root-mean-square deviation (rmsd) of the quinazoline core in GFT during the whole simulation revealed average values of 1.9 Å (Fig. S13†). This is due to the interaction of its quinazoline ring with the side chain of Tyr161, which is located on top, establishing a strong  $\pi$ - $\pi$  stacking between them. The analysis of the variation of the relative distance between the mass center of the phenol group in Tyr161 and the quinazoline





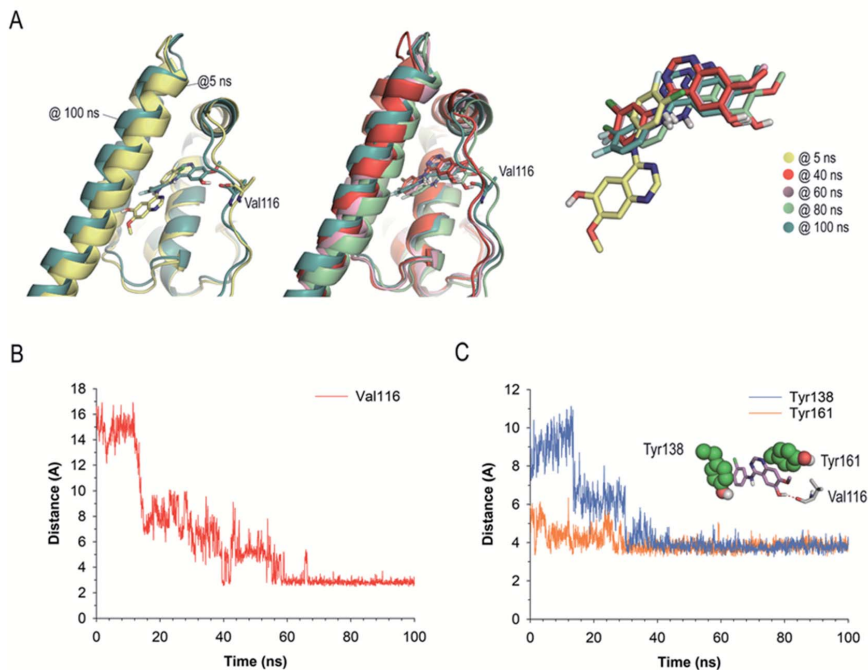


Fig. 10 (A) Comparison of several snapshots of GFT-MB@HSA during 100 ns of MD simulation. GFT-MB and Val116 are shown as sticks. Note that during the simulation GFT-MB was displaced towards the bottom part of the pocket to locate its hydroxyl group pointing towards the main carbonyl group of Val116, remaining in this arrangement after  $\sim 15$  ns of simulation. (B) Variation of the relative distance between the oxygen atom (OH group) of the quinazoline moiety in GFT-MB and the oxygen atom of the main carbonyl group of Val116 in the GFT-MB@HSA protein complex during whole simulation. (C) Variation of the relative distance between the mass center of the phenol groups in Tyr138 and Tyr161 and GFT-MB in the GFT-MB@HSA protein complex during whole simulation. Note how, after stabilization, both residues remain in close contact with the ligand during the simulation.

moiety of GFT in the complex during the whole simulation showed average distances of  $3.7 \text{ \AA}$  (Fig. S14<sup>†</sup>). In addition, the arrangement of GFT in subdomain IB of HSA is further stabilized by numerous lipophilic interactions with the non-polar residues within the pocket, specifically Leu115, Pro118, Met123, Phe134, Tyr138, Leu139, Ile142, Phe149, Leu154, Phe157, Ala158, Phe165, Leu182, and Gly189.

The binding mode of GFT-MB was clearly different from that observed for GFT, since the lack of the flexible chain allows it to bury itself in the pocket, stabilizing its arrangement through a strong hydrogen bonding interaction with the protein, specifically between its hydroxyl group and the main carbonyl group in Val116 (Fig. 9B). In fact, after  $\sim 15$  ns of simulation, GFT-MB moved away from the position identified by docking (like GFT) towards the bottom of the pocket to establish a direct contact with Val116, remaining fixed in this arrangement during the rest of the simulation (Fig. 10A). The average distance of the latter interaction during the last 50 ns of simulation was  $3.2 \text{ \AA}$  (Fig. 10B). The position of GFT-MB is also frozen through strong  $\pi$ - $\pi$  stacking with the phenol groups of Tyr161 and Tyr138, which are located on both faces of the

ligand. The average distance between the mass center of the phenol groups and the quinazoline moiety in GFT-MB during the last 50 ns of simulation was  $3.8 \text{ \AA}$  (Fig. 10C). As for GFT, diverse lipophilic interactions with the non-polar residues of the pocket, specifically Leu115, Pro118, Met123, Phe134, Leu135, Ile142, Phe149, Leu154, Phe157, and Ala158, were also identified.

## Conclusions

The photobehavior of GFT-MB, a photoactive GFT metabolite, has been compared with that of its parent drug in different media, *i.e.* in solution and within HSA. To this end, fluorescence and transient absorption spectroscopies, from the femtosecond to the microsecond time scales have been used. Besides, MD simulations have been performed to explain in atomic detail the experimental results. The main excited species detected for both GFT and GFT-MB in solution are very similar. Thus, locally excited (LE) states are mainly formed in non-polar solvents, whereas intramolecular charge transfer (ICT) species predominate in polar solvents. Triplet excited states are detected in both



polar and non-polar organic solvents; from this species, a type I mechanism seems to operate in the photodamage to biomolecules, since the resulting radicals have been detected by means of LFP. By contrast, significant differences are observed in the photobehavior of both the drug or the metabolite within the constrained environment provided by HSA. Thus, for GFT@HSA, LE species are instantaneously formed, which can photoinduce electron transfer with appropriate donors (e.g. Tyr or Trp residues). On the contrary, since the metabolite is a phenol, excited state proton transfer to form phenolate-like excited species occurs in GFT-MB@HSA. MD simulations have confirmed the occurrence of this process, which might hinder the formation of triplet species in the protein-bound metabolite. Since phenolate-like excited species exhibit much higher fluorescence yields and longer lifetimes than GFT@HSA, this might have consequences in the photosensitizing potential of GFT-MB, which can be anticipated to be higher than that of GFT.

## Data availability

All details about the experimental and computational data related with this article are included in the Experimental Section of this manuscript. Additional spectroscopic and theoretical results are provided in the ESI.†

## Author contributions

Research was conceived by all authors. Experiments were performed by L. T., M. O and E. L., with the aid of C. G.-B., I. A and I. V. The research was supervised by C. G.-B., I. A., I. V. and M. A. M. All authors contributed to the writing of the manuscript and ESI.†

## Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

## Acknowledgements

Financial support from the Spanish Ministry of Science and Innovation (RYC-2015-17737, BEAGAL 18/00211, PID2020-115010RB-I00/AEI/10.13039/501100011033, FPU19/00048, PID2019-105512RB-I00/AEI/10.13039/501100011033), the Xunta de Galicia (ED431C 2021/29), the Centro singular de investigación de Galicia accreditation 2019–2022 (ED431G 2019/03), and the European Regional Development Fund (ERDF) is gratefully acknowledged. All authors are grateful to the Centro de Supercomputación de Galicia (CESGA) for use of the Finis Terrae computer.

## References

- 1 M. Gonçalo, in *Contact Dermatitis*, ed. J. D. Johansen, Springer-Verlag, Berlin, 2011, ch. 18, pp. 361–376.
- 2 K. R. Stein and N. S. Scheinfeld, *Expert Opin. Drug Saf.*, 2007, **6**, 431–443.

- 3 J. Kowalska, J. Rok, Z. Rzepka and D. Wrzesniok, *Pharmaceuticals*, 2021, **14**, 723.
- 4 I. Vayá, V. Lhiaubet-Vallet, M. C. Jimenez and M. A. Miranda, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 4102–4122.
- 5 M. H. Cohen, G. A. Williams, R. Sridhara, G. Chen and R. Pazdur, *Oncologist*, 2003, **8**, 303–306.
- 6 J. G. Paez, P. A. Jänne, J. C. Lee, S. Tracy, H. Greulich, S. Gabriel, P. Herman, F. J. Kaye, N. Lindeman, T. J. Boggon, K. Naoki, H. Sasaki, Y. Fujii, M. J. Eck, W. R. Sellers, B. E. Johnson and M. Meyerson, *Science*, 2004, **304**, 1497–1500.
- 7 P. Cohen, D. Cross and P. A. Janne, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2021, **20**, 551–569.
- 8 L. Huang, S. Jiang and Y. Shi, *J. Hematol. Oncol.*, 2020, **13**, 143.
- 9 C. Pottier, M. Fresnais, M. Gilon, G. Jerusalem, R. Longuespee and N. E. Sounni, *Cancers*, 2020, **12**, 731.
- 10 R. Thomas and Z. Weihua, *Front. Oncol.*, 2019, **9**, 800.
- 11 D. Veale, T. Ashcroft, C. Marsh, G. J. Gibson and A. L. Harris, *Br. J. Cancer*, 1987, **55**, 513–516.
- 12 L. Tamarit, M. El Ouardi, I. Andreu, I. Vayá and M. A. Miranda, *Chem. Sci.*, 2021, **12**, 12027–12035.
- 13 J. T. Hartmann, M. Haap, H.-G. Kopp and H.-P. Lipp, *Curr. Drug Metab.*, 2009, **10**, 470–481.
- 14 T. P. Selvam and P. V. Kumar, *Res. Pharm.*, 2011, **1**, 1–21.
- 15 G. García-Láinez, I. Vayá, M. P. Marín, M. A. Miranda and I. Andreu, *Arch. Toxicol.*, 2021, **95**, 169–178.
- 16 I. Vayá, I. Andreu, E. Lence, C. González-Bello, M. C. Cuquerella, M. Navarrete-Miguel, D. Roca-Sanjuan and M. A. Miranda, *Chem.-Eur. J.*, 2020, **26**, 15922–15930.
- 17 I. Andreu, E. Lence, C. Gonzalez-Bello, C. Mayorga, M. C. Cuquerella, I. Vayá and M. A. Miranda, *Front. Pharmacol.*, 2020, **11**, 576495.
- 18 Y. Toyama, J. Ueyama, H. Nomura, I. Tsukiyama, H. Saito, T. Hisada, K. Matsuura and T. Hasegawa, *Anticancer Res.*, 2014, **34**, 2283–2290.
- 19 A. Spitaleri and W. Rocchia, in *Biomolecular Simulations in Structure-Based Drug Discovery*, ed. F. L. Gervasio and V. Spiwok, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2019, pp. 29–39.
- 20 R. Pérez-Ruiz, E. Lence, I. Andreu, D. Limones-Herrero, C. González-Bello, M. A. Miranda and M. C. Jiménez, *Chem.-Eur. J.*, 2017, **23**, 13986–13994.
- 21 G. Jones, P. Willett, R. C. Glen and R. Taylor, *J. Mol. Biol.*, 1997, **267**, 727–748.
- 22 P. A. Zunszain, J. Ghuman, T. Komatsu, E. Tsuchida and S. Curry, *BMC Struct. Biol.*, 2003, **3**, 6.
- 23 D. A. Case, R. M. Betz, D. S. Cerutti, T. E. Cheatham, T. A. Darden, R. E. Duke, T. J. Giese, H. Gohlke, A. W. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. J. Kaus, A. Kovalenko, T. S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, D. Mermelstein, K. M. M. Merz, G. Monard, H. Nguyen, H. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, D. R. R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, C. L. Simmerling, W. M. Botello-Smith, J. Swails, R. Walker, J. Wang, R. M. Wolf, X. Wu, L. Xiao and P. A. Kollman, *Amber*, University of California, San Francisco, CA, USA, 2016.



- 24 W. L. DeLano, *The PyMOL Molecular Graphics System*, DeLano Scientific LLC, Palo Alto, CA, 2008, 2021, <http://www.pymol.org/>.
- 25 B. R. Miller 3rd, T. D. McGee Jr, J. M. Swails, N. Homeyer, H. Gohlke and A. E. Roitberg, *J. Chem. Theory Comput.*, 2012, **8**, 3314–3321.
- 26 M. Montalti, A. Credi, L. Prodi and M. T. Gandolfi, *Handbook of Photochemistry*, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, 2006.
- 27 C. Ruckebusch, M. Sliwa, P. Pernot, A. de Juan and R. Tauler, *J. Photochem. Photobiol., C*, 2012, **13**, 1–27.
- 28 G. Cosa and J. C. Scaliano, *Photochem. Photobiol.*, 2004, **80**, 159–174.
- 29 M. S. Baptista, J. Cadet, P. Di Mascio, A. A. Ghogare, A. Greer, M. R. Hamblin, C. Lorente, S. C. Nunez, M. S. Ribeiro, A. H. Thomas, M. Vignoni and T. M. Yoshimura, *Photochem. Photobiol.*, 2017, **93**, 912–919.
- 30 D. I. Pattison, A. S. Rahmanto and M. J. Davies, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2012, **11**, 38–53.
- 31 T. Peters, in *All about Albumin - Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, Elsevier, Academic Press, San Diego, 1995, ch. 3, pp. 76–132.
- 32 A. Z. Weller, *Phys. Chem.*, 1982, **133**, 93–98.
- 33 A. Harriman, *J. Phys. Chem.*, 1987, **91**, 6102–6104.
- 34 C.-Y. Lu and Y.-Y. Liu, *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, **1571**, 71–76.
- 35 I. Vayá, I. Andreu, V. T. Monje, M. C. Jimenez and M. A. Miranda, *Chem. Res. Toxicol.*, 2016, **29**, 40–46.
- 36 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gefitinib>.
- 37 A. Albert and J. N. Phillips, *J. Chem. Soc.*, 1956, 1294–1304.
- 38 T. Peters, in *Advances in Protein Chemistry*, Academic Press, New York, 1985, vol. 37, pp. 161–245.
- 39 C. Y. Huang, *Methods Enzymol.*, 1982, **87**, 509–525.
- 40 T. Wybranowski, M. Cyrankiewicz, B. Ziolkowska and S. Kruszewski, *Biosystems*, 2008, **94**, 258–262.
- 41 T. Itoh, Y. Saura, Y. Tsuda and H. Yamada, *Chirality*, 1997, **9**, 643–649.
- 42 M. Z. Kabir, W.-V. Tee, S. B. Mohamad, Z. Alias and S. Tayyab, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 91756–91767.
- 43 J. Li, J. Brahmmer, W. Messersmith, M. Hidalgo and S. D. Baker, *Invest. New Drugs*, 2006, **24**, 291–297.
- 44 J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, 3rd edn, 2006.
- 45 M. Lukeman and P. Wan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 9458–9464.
- 46 P. Bonancia, I. Vayá, D. Markovitsi, T. Gustavsson, M. C. Jimenez and M. A. Miranda, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 1958–1963.
- 47 X. Chen, D. S. Larsen, S. E. Bradforth and I. H. van Stokkum, *J. Phys. Chem. A*, 2011, **115**, 3807–3819.
- 48 G. Rabbani and S. N. Ahn, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, **123**, 979–990.
- 49 J. Wang, W. Wang, P. A. Kollman and D. A. Case, *J. Mol. Graphics Modell.*, 2006, **25**, 247–260.
- 50 J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman and D. A. Case, *J. Comput. Chem.*, 2004, **25**, 1157–1174.





# Modulation of the photobehavior of gefitinib and its phenolic metabolites by human transport proteins

Lorena Tamarit<sup>1</sup>, Meryem El Ouardi<sup>1</sup>, Emilio Lence<sup>2</sup>, Inmaculada Andreu<sup>1</sup>, Concepción González-Bello<sup>2</sup>, Miguel A. Miranda<sup>1</sup>, Ignacio Vaya<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universitat Politècnica de València, Spain, <sup>2</sup>Universidade de Santiago de Compostela, Spain

**Submitted to Journal:**  
Frontiers in Pharmacology

**Specialty Section:**  
Drug Metabolism and Transport

**Article type:**  
Original Research Article

**Manuscript ID:**  
1387057

**Received on:**  
16 Feb 2024

**Journal website link:**  
[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)

In review

---

## Scope Statement

Our research work is focused on the binding of the anticancer drug gefitinib (GFT) and its main photoactive phenolic metabolites (GFT-M1 and GFT-M2) to human serum albumin (HSA) and  $\alpha$ 1-acid glycoprotein (HAG). The results show the strong influence of the proteins on the photobehavior of the excited drug (or metabolite) in the supramolecular complexes. Excitation of GFT-M2@HSA at 340 nm leads mainly to formation of locally excited states, whereas phenolate-like species predominate in HAG. By contrast, a diverging behavior is observed for GFT-M1, which forms phenolate-like species as the only excited states in HSA, while locally excited states are also formed within HAG. As regards GFT, locally excited states are primarily formed in the two proteins. These results are supported by molecular dynamics simulations, which rationalize the variability detected in the photoinduced processes and the type of excited species formed in the protein cavities based on the differences in the ligand binding mode, the type of interactions with the protein, and the arrangement of key functional groups involved in the ligand structure. In general, the differences observed in the photobehavior of the drug and its two photoactive metabolites in protein media are consistent with their relative photosensitizing potentials.

## Conflict of interest statement

The authors declare a potential conflict of interest and state it below

The author(s) declared that they were not an editorial board member of Frontiers, at the time of submission.

## CRedit Author Statement

**Concepción González-Bello:** Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Software, Writing - review & editing. **Emilio Lence:** Data curation, Formal Analysis, Methodology, Software, Writing - review & editing. **Inmaculada Andreu:** Funding acquisition, Investigation, Supervision, Writing - review & editing. **Ignacio Vaya:** Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Lorena Tamarit:** Data curation, Formal Analysis, Methodology, Writing - review & editing. **Meryem El Ouardi:** Data curation, Formal Analysis, Methodology, Writing - review & editing. **Miguel Angel Miranda:** Conceptualization, Investigation, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing.

## Keywords

anticancer drugs, fluorescence, Metabolites, molecular dynamics, protein binding constants

## Abstract

Word count: 318

The photobiological damage that certain drugs or their metabolites can photosensitize in proteins is generally associated with the nature of the excited species that are generated upon interaction with UVA light. In this regard, the photoinduced damage of the anticancer drug gefitinib (GFT) and its two main photoactive metabolites GFT-M1 and GFT-M2 in cellular milieu was recently investigated. With this background, the photophysical properties of both the drug and its metabolites have now been studied in the presence of the two main transport proteins of human plasma, i. e. serum albumin (HSA) and  $\alpha$ 1-acid glycoprotein (HAG) upon UVA light excitation. In general, the observed photobehavior was strongly affected by the confined environment provided by the protein. Thus, GFT-M1 (which exhibits the highest phototoxicity) showed the highest fluorescence yield arising from long-lived HSA-bound phenolate-like excited species. Conversely, locally excited (LE) states were formed within HAG, resulting in lower fluorescence yields. The reverse was true for GFT-M2, which despite being also a phenol, led mainly to formation of LE states within HSA, and phenolate-like species (with a minor contribution of LE) inside HAG. Finally, the parent drug GFT, which is known to form LE states within HSA, exhibited a parallel behavior in the two proteins. In addition, determination of the association constants by both absorption and emission spectroscopy revealed that the two metabolites bind stronger to HSA than the parent drug, whereas smaller differences were observed for HAG. This was further confirmed by studying the competing interactions between GFT or its metabolites with the two proteins using fluorescence measurements. These above experimental findings were satisfactorily correlated with the results obtained by means of molecular dynamics (MD) simulations, which revealed the high affinity binding sites, the strength of interactions and the involved amino acid residues. In general, the differences observed in the photobehavior of the drug and its two photoactive metabolites in protein media are consistent with their relative photosensitizing potentials.

### ***Funding information***

Grants PID2020-115010RB-I00 and PID2022-136963OB-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033, grant CIAICO/2021/061 funded by Conselleria d'Innovació, Universitats, Ciència i Societat Digital and grant AP2022-5 funded by Programa d'Accions Preparatòries UV-La Fe. Grants from the Xunta de Galicia [ED431C 2021/29 and the Centro singular de investigación de Galicia accreditation 2019-2022 (ED431G 2019/03), CG-B], and the European Regional Development Fund (ERDF).

### ***Funding statement***

The author(s) declare that financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article.

### ***Ethics statements***

#### ***Studies involving animal subjects***

Generated Statement: No animal studies are presented in this manuscript.

#### ***Studies involving human subjects***

Generated Statement: No human studies are presented in the manuscript.

#### ***Inclusion of identifiable human data***

Generated Statement: No potentially identifiable images or data are presented in this study.

#### ***Data availability statement***

Generated Statement: The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

In review

## Modulation of the photobehavior of gefitinib and its phenolic metabolites by human transport proteins

1 Lorena Tamarit,<sup>1,2</sup> Meryem El Ouardi,<sup>1,2</sup> Emilio Lence,<sup>3</sup> Inmaculada Andreu,<sup>1,2</sup> Concepción  
2 González-Bello,<sup>\*3</sup> Miguel A. Miranda,<sup>\*1,2</sup> Ignacio Vayá<sup>\*1,2</sup>

3 <sup>1</sup>Departamento de Química/Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC, Universitat Politècnica de  
4 València, Camino de Vera s/n, 46022 València, Spain.

5 <sup>2</sup>Unidad Mixta de Investigación UPV-IISLaFe, Hospital Universitari i Politécnic La Fe, València,  
6 Spain.

7 <sup>3</sup>Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CiQUS),  
8 Departamento de Química Orgánica, Universidade de Santiago de Compostela, Jenaro de la Fuente  
9 s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain.

### 10 \* Correspondence:

11 Corresponding Author

12 Miguel A. Miranda, mmiranda@qim.upv.es

13 Ignacio Vayá, igvapre@qim.upv.es

14 Concepción González-Bello, concepcion.gonzalez.bello@usc.es

15 **Keywords:** anticancer drugs, fluorescence, metabolites, molecular dynamics, protein binding  
16 constants

### 17 Abstract

18 The photobiological damage that certain drugs or their metabolites can photosensitize in proteins is  
19 generally associated with the nature of the excited species that are generated upon interaction with  
20 UVA light. In this regard, the photoinduced damage of the anticancer drug gefitinib (GFT) and its  
21 two main photoactive metabolites GFT-M1 and GFT-M2 in cellular milieu was recently investigated.  
22 With this background, the photophysical properties of both the drug and its metabolites have now  
23 been studied in the presence of the two main transport proteins of human plasma, *i. e.* serum albumin  
24 (HSA) and  $\alpha$ 1-acid glycoprotein (HAG) upon UVA light excitation. In general, the observed  
25 photobehavior was strongly affected by the confined environment provided by the protein. Thus,  
26 GFT-M1 (which exhibits the highest phototoxicity) showed the highest fluorescence yield arising  
27 from long-lived HSA-bound phenolate-like excited species. Conversely, locally excited (LE) states  
28 were formed within HAG, resulting in lower fluorescence yields. The reverse was true for GFT-M2,  
29 which despite being also a phenol, led mainly to formation of LE states within HSA, and phenolate-  
30 like species (with a minor contribution of LE) inside HAG. Finally, the parent drug GFT, which is  
31 known to form LE states within HSA, exhibited a parallel behavior in the two proteins. In addition,  
32 determination of the association constants by both absorption and emission spectroscopy revealed  
33 that the two metabolites bind stronger to HSA than the parent drug, whereas smaller differences were  
34 observed for HAG. This was further confirmed by studying the competing interactions between GFT  
35 or its metabolites with the two proteins using fluorescence measurements. These above experimental  
36 findings were satisfactorily correlated with the results obtained by means of molecular dynamics  
37 (MD) simulations, which revealed the high affinity binding sites, the strength of interactions and the  
38 involved amino acid residues. In general, the differences observed in the photobehavior of the drug

39 and its two photoactive metabolites in protein media are consistent with their relative  
40 photosensitizing potentials.

## 41 **1 Introduction**

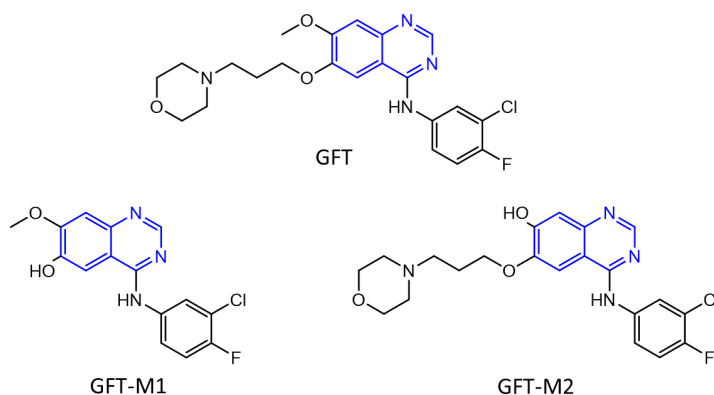
42 The binding of drugs to plasma proteins is involved in the modulation of relevant processes including  
43 drug pharmacokinetics (*i. e.* absorption, distribution, metabolism and elimination) and  
44 pharmacodynamics (pharmacological effects). (Krasner, 1972; Kragh-Hansen et al., 2002; Vuignier et  
45 al., 2010) This binding is usually reversible, with an equilibrium between bound and free drug. In this  
46 regard, it is commonly stated that only unbound drugs are pharmacologically and toxicologically  
47 active since they can cross membrane barriers to be distributed to tissues. (Lindup and Orme, 1981)  
48 However, photochemically active drugs can induce damage to biomolecules after absorption of solar  
49 light, which is generally associated with phototoxicity and photoallergy. (Quintero and Miranda,  
50 2000; Stein and Scheinfeld, 2007; Vayá et al., 2014; Monteiro et al., 2016; Blakely et al.,  
51 2019; Kowalska et al., 2021) Hence, the interaction of photoactive compounds with plasma proteins  
52 must have a strong influence on drug biological effects, beyond the transport and the intrinsic  
53 photochemical properties associated with the chemical structure of the drug. In this context, drugs  
54 containing the quinazoline moiety (highlighted in blue in Figure 1) are known to produce  
55 photodermatitis. (Selvam and Kumar, 2011)

56 The photosensitizing potential associated with this moiety is well exemplified by gefitinib (GFT),  
57 which is an orally active first-generation tyrosine kinase inhibitor (TKI) (Solassol et al., 2019; Huang  
58 et al., 2020; Pottier et al., 2020; Cohen et al., 2021) clinically used for the treatment of lung cancer and  
59 locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer. (Cohen et al., 2003; Paez et al., 2004) GFT  
60 is metabolized via CYP3A4 to form a variety of derivatives (Hartmann et al., 2009) including those  
61 shown in Figure 1, *O*-desmorpholinopropyl gefitinib (GFT-M1) and *O*-desmethyl gefitinib (GFT-  
62 M2), which have recently revealed to be biologically photoactive. (El Ouardi et al., 2023) Lapatinib  
63 (LAP), which is other TKI currently used for the treatment of lung and breast cancers. (Lin et al.,  
64 2008; Medina and Goodin, 2008; Lin et al., 2009) is also a relevant example. In both cases, both the  
65 parent drug and their photoactive metabolites can induce damage in cellular milieu. (García-Lainez et  
66 al., 2021; Tamarit et al., 2021; El Ouardi et al., 2023) the associated mechanism is related with the  
67 excited species that are formed upon irradiation of the supramolecular drug or metabolite@protein  
68 complexes with UVA light. (Andreu et al., 2020; Vayá et al., 2020; Tamarit et al., 2021; Tamarit et al.,  
69 2022)

70 Human serum albumin (HSA) and human  $\alpha_1$ -acid glycoprotein (HAG) are the most abundant  
71 proteins in plasma. One of their main physiological functions is to transport a broad variety of drugs  
72 with sufficient affinity through the bloodstream for their selective delivery to specific  
73 targets. (Trainor, 2007) generally, the binding affinity ( $K_B$ ) is in the range of  $10^4$  -  $10^6$  M<sup>-1</sup>. (Kremer et  
74 al., 1988; Carter and Ho, 1994; Peters, 1995; Huang and Ung, 2013) In particular, HSA is the most  
75 abundant protein in blood plasma, and contains multiple binding sites, *i. e.* stie I, II and II, where  
76 acidic, neutral, and basic drugs can interact. (Sudlow et al., 1976; Zsila, 2013) As regards HAG, it is a  
77 highly glycosylated protein that contains multiple binding sites, but generally drugs bind almost  
78 exclusively to a large and flexible cavity. (Kremer et al., 1988; Maruyama et al., 1990) Its  
79 concentration is much lower than that of HSA, but since it is an acute-phase protein, its serum levels  
80 can be increased in certain disease states including inflammation, depression and cancer. (Kremer et  
81 al., 1988) In this context, it has been previously proposed that high concentration of HAG can affect  
82 the pharmacodynamics of some drugs in vivo. (Yoo et al., 1996; Holladay et al., 1998; Gambacorti-  
83 Passerini et al., 2003; Trainor, 2007)

84 Recent publications about the photobehavior of GFT and GFT-M1 within HSA correlate their  
85 photophysical properties with their photosensitizing potential.(Tamarit et al., 2021;Tamarit et al.,  
86 2022) In this regard, selective excitation of the protein-bound drug results in emission from locally  
87 excited (LE) singlet states; their main features are to display maximum fluorescence at wavelengths  
88 *ca.* 390 nm with low quantum yields ( $\phi_F \sim 0.02$ ) and short lifetimes ( $\tau_F \sim 1.3$  ns). Noteworthy, the  
89 fluorescence profile of GFT@HSA is very similar to that observed in non-polar solvents such as  
90 cyclohexane, where formation of LE states has been demonstrated by means of ultrafast transient  
91 absorption spectroscopy. Concerning GFT-M1, although its fluorescence properties in organic  
92 solvents are comparable with those of GFT, remarkable differences are noticed after binding with  
93 HSA; here, excited state proton transfer (ESPT) to form phenolate-like species, which emit at longer  
94 wavelengths ( $\lambda_{max} \sim 430$  nm) and higher  $\tau_F$  values ( $\sim 2.5$  ns) than LE sates, is the predominant  
95 process.(Tamarit et al., 2022) This result is supported by means of ultrafast spectroscopy and by  
96 molecular docking (MD) simulations. The photosensitizing damage from both GFT and GFT-M1 in  
97 the biological media is consistent with the involvement of a type I mechanism.(Tamarit et al.,  
98 2021;Tamarit et al., 2022;El Ouardi et al., 2023)

99 In view of the importance of drug or metabolite@protein interactions, the binding of GFT and its two  
100 photoactive metabolites GFT-M1 and GFT-M2 with the main transport proteins in plasma has been  
101 investigated in the present work. To this end, spectroscopic techniques in the steady-state and time-  
102 resolved modes have been used. In this regard, fluorescence spectroscopy is a widely used analytical  
103 technique to study ligand@protein interactions due to its high sensitivity and capability to probe  
104 different microenvironments. Thus, the yield of transients formation in addition to their spectral  
105 profile and kinetics evolution may be strongly affected by the surroundings of the investigated ligand  
106 (*i. e.* drug or metabolite).(Vayá et al., 2014) From the emission spectra and lifetimes of the excited  
107 species formed in the ligand@protein complexes, it has been possible to determine binding constants  
108 and the stoichiometry of the complex. In parallel, molecular dynamics (MD) simulations have also  
109 been done with the aim of investigating in atomic detail the binding of GFT, GFT-M1 and GFT-M2  
110 within HSA and HAG, to achieve a better understanding of the experimental results. In this context,  
111 MD simulations has proven to be a powerful tool for studying the strength and conformational  
112 characteristics of the interactions of a drug with the amino acids located in the protein binding  
113 sites.(Pérez-Ruiz et al., 2017;Spitaleri and Rocchia, 2019;Vayá et al., 2020) All these features are  
114 relevant since they can be directly connected with the photosensitizing potential recently reported for  
115 GFT and its metabolites GFT-M1 and GFT-M2.(El Ouardi et al., 2023)



117 **FIGURE 1.** Chemical structure of gefitinib (GFT) and its O-desmorpholinopropyl and O-desmethyl  
118 metabolites GFT-M1 and GFT-M2, respectively. The quinazoline chromophore is highlighted in blue.

## 119 **2 Materials and methods**

### 120 **2.1 Chemicals and Reagents**

121 Gefitinib (GFT) and O-desmethyl gefitinib (GFT-M2) were purchased from Quimigen. O-  
122 Desmorpholinopropyl gefitinib (GFT-M1) was purchased from Fluorochem. N-Acetyl-L-tyrosine  
123 methyl ester (NAc-TyrMe), N-acetyl-L-tryptophan methyl ester (NAc-TrpMe), anthracene, human  
124 serum albumin (HSA) and  $\alpha_1$ -acid glycoprotein from human plasma (HAG) were purchased from  
125 Sigma-Aldrich. PBS Buffer was prepared by dissolving phosphate-buffered saline tablets (Sigma)  
126 using ultrapure water from a Millipore (Milli-Q Synthesis) system. Spectrophotometric solvents  
127 (acetonitrile, 1,4-dioxane, toluene and cyclohexane) were obtained from Scharlab and used without  
128 further purification.

### 129 **2.2 Spectroscopic Measurements**

130 Steady-state absorption spectra were recorded in a JASCO V-760 spectrophotometer. Steady-state  
131 fluorescence spectra were recorded on an Edinburgh FS5 spectrofluorometer, provided with a  
132 monochromator in the wavelength range of 200-900 nm using an excitation wavelength of 340 nm at  
133 room temperature. Measurements on drug@protein complexes were performed in aerated PBS of 1:1  
134 molar ratio mixtures at 10  $\mu$ M. The absorbance of the samples at the excitation wavelength was kept  
135 below 0.1. The fluorescence quantum yields were determined using anthracene in ethanol as  
136 reference.(Montalti et al., 2006)

137 A modified Scatchard analysis has been used to determine the binding constants ( $K_B$ ) of GFT, GFT-  
138 M1 and GFT-M2 within HSA and HAG either from fluorescence (F) or absorption (A)  
139 measurements,(Healy, 2007) following equation 1:

$$140 \quad \frac{F_{max}-F_0}{F-F_0} = \frac{1}{K_B} \cdot [P]^{-1} + 1 \quad (\text{equation 1})$$

141 where  $F_{max}$  is the fluorescence maximum when all possible ligand is bound to the protein,  $F_0$  is the  
142 fluorescence maximum of the free ligand,  $F$  is the fluorescence maximum observed for a given  
143 protein concentration  $[P]$ , and  $K_B$  is the binding constant of the ligand with the protein. To calculate  
144 the  $K_B$  values by means of UV absorption spectroscopy, the same equation 1 has been applied but  
145 using  $A$  instead of  $F$ .

146 Time-resolved fluorescence measurements were performed with an EasyLife X system containing a  
147 sample compartment composed of an automated peltier cuvette holder to control the temperature at  
148 24  $^{\circ}$ C, a pulsed LED excitation source and a lifetime detector. The employed LED excitation source  
149 was 340 nm, with emission filter of WG370. The fluorescence lifetimes ( $\tau_f$ ) were obtained upon  
150 fitting the decay traces by a non-linear fitting/deconvolution procedure  $F(t) = \sum a_i \exp(-t/\tau_i)$  by means  
151 of a one- or two-exponential function, depending on the investigated system. All spectroscopic  
152 measurements were done in  $10 \times 10 \text{ mm}^2$  quartz cuvettes at room temperature.

153

154

## 155 2.3 Molecular Docking

156 These calculations were performed using GOLD program version 2020.3.0,(Jones et al., 1997) and  
157 the protein coordinates were taken from the crystal structures of HSA in complex with hemin and  
158 myristic acid (PDB ID 1O9X) (Zunszain et al., 2003) and of HAG in the unbound form (PDB ID  
159 3KQ0).(Schönfeld et al., 2008) The experimental procedure was similar to that described for LAP,  
160 N-LAP and O-LAP in HSA.(Andreu et al., 2020) For GFT and GFT-M2, the protonated forms of the  
161 morpholine moiety were employed since they predominate at physiological pH.(Domotor et al.,  
162 2018)

## 163 2.4 Molecular Dynamics Simulation Studies

164 The proteins in complex with the highest score solution obtained by docking were immersed in a  
165 truncated octahedron of TIP3P water molecules and neutralized using the molecular mechanics force  
166 field ff14SB and GAFF of AMBER.(Case et al., 2021) The resulting systems were submitted to 100  
167 ns of dynamic simulation following our previously reported protocol.(Andreu et al., 2020) Briefly,  
168 the experimental procedure involved: (i) minimization and charge distribution of the ligands (GFT,  
169 GFT-M1 and GFT-M2) using Gaussian 09;(Frisch et al., 2009) (ii) generation and minimization of  
170 the binary GFT@protein, GFT-M1@protein and GFT-M2@protein complexes using the poses  
171 obtained by docking; and (iii) simulations of the resulting minimized ligand@protein complexes. The  
172 cpptraj module in AMBER 20 was used to analyze the trajectories and to calculate the root-mean-  
173 square deviation (rmsd) of the protein and the ligand during the simulation.(Case et al., 2021) The  
174 molecular graphics program PyMOL(DeLano) was employed for visualization and depicting enzyme  
175 structures. For Figures related to HSA and HAG, the amino acid numbering described in PDB entries  
176 1O9X and 3KQ0, respectively, was employed.

## 177 3 Results and discussion

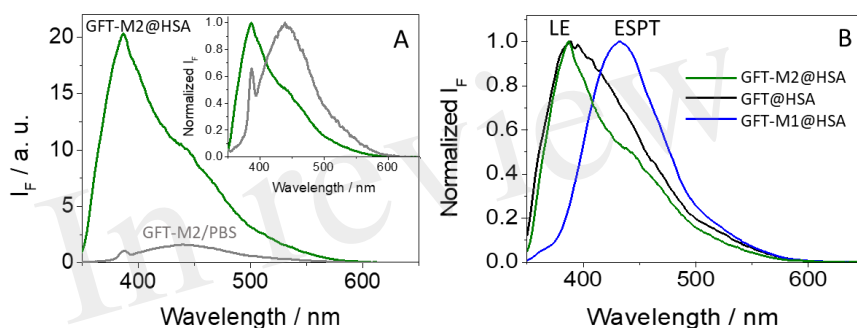
178 As stated above, the photophysical properties of either GFT and GFT-M1 are strongly affected by the  
179 environment; hence, ICT states are detected in polar organic solvents, whereas LE species are  
180 predominantly formed in non-polar ones and in GFT@HSA; by contrast, ESPT is the main process  
181 occurring for GFT-M1 in protein medium.(Tamarit et al., 2021;Tamarit et al., 2022) In view of this  
182 variability, the photobehavior of GFT-M2 was investigated here, first in organic solvents of different  
183 polarities to identify the excited species that can be formed upon irradiation with UVA light.

184 The UV absorption spectra of GFT-M2 were almost similar in all solvents (Supplementary Figure  
185 S1), while the fluorescence properties were strongly affected by the polarity (Supplementary Figure  
186 S2). By comparison with previous results on GFT and GFT-M1, emission from LE states was  
187 expected also for GFT-M2 in non-polar solvents. Actually, in these media, fluorescence maxima  
188 were found at  $\lambda_{\max}$  ca. 390 nm with higher  $\phi_F$  values and shorter  $\tau_F$  than those detected in polar  
189 solvents, where intramolecular charge transfer (ICT) excited species are generally formed.(Tamarit et  
190 al., 2021;Tamarit et al., 2022)

191 The photobehavior of GFT-M2 in a more complex biological environment such as that provided by  
192 the HSA binding sites has been examined. First, Job's plot analysis(Huang, 1982) allowed  
193 determination of a 1:1 stoichiometry for the protein-metabolite complex (Supplementary Figure S3).  
194 Its photophysical properties have been studied at  $\lambda_{\text{exc}} = 340$  nm, where the protein does not absorb  
195 and GFT-M2 is selectively irradiated (Supplementary Figure S4). As it can be observed from Figure  
196 2A, a noticeable fluorescence enhancement was observed upon binding with the protein.



197 Interestingly, the emission profile of GFT-M2 strongly varied depending on the microenvironment;  
 198 so, a maximum at *ca.* 440 nm was detected for GFT-M2 free in the bulk solution, while a shift  
 199 towards much shorter wavelengths ( $\sim 388$  nm) occurred upon binding with HSA (inset in Figure 2A).  
 200 Since GFT-M2 is a phenol, this can be explained as a result of a proton transfer process occurring in  
 201 the bulk solution, which is hindered within the protein cavities; this is supported by UV absorption  
 202 spectroscopy, where the shoulder between 370-400 nm (Supplementary Figure S4C), associated to  
 203 phenolates, practically disappears in the supramolecular complex. This effect is even clearer at  
 204 different GFT-M2/HSA ratios, where formation of phenolate-like species was lower at high protein  
 205 concentrations (Supplementary Figure S5A). These results contrast with those previously observed  
 206 for GFT-M1 (Supplementary Figures S4B and S5B), which is also a phenol but ESPT is the main  
 207 process within HSA thanks to hydrogen bonding with Val116.(Tamarit et al., 2022) Therefore, the  
 208 emission profile of GFT-M2 within HSA is comparable with that of the protein-bound GFT (Figure  
 209 2B); consequently, LE states are formed in GFT-M2@HSA.

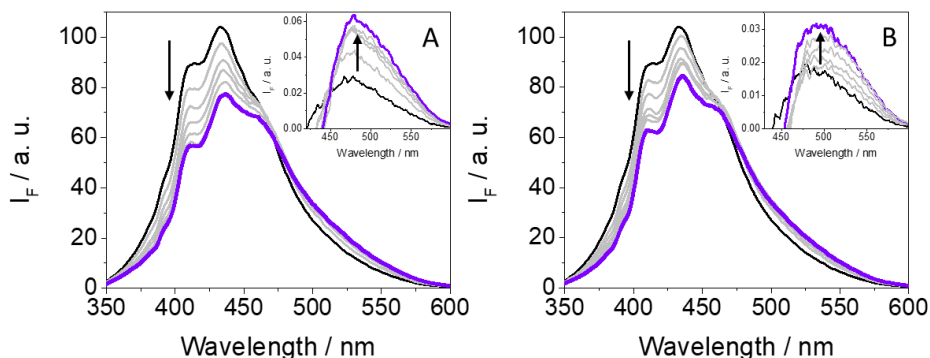


210

211 **FIGURE 2.** A) Fluorescence spectra for GFT-M2 in PBS (gray) and for GFT-M2@HSA (green).  
 212 The inset shows the normalized spectra. B) Normalized fluorescence spectra for GFT-M2@HSA  
 213 (green), GFT@HSA (black) and GFT-M1@HSA (blue). Measurements were performed at  $\lambda_{exc} = 340$   
 214 nm in PBS; for ligand@HSA complexes, solutions were at 1:1 molar ratio (10  $\mu$ M).

215 An important point to discuss is the low fluorescence yield value of GFT-M2 within the protein  
 216 cavities ( $\phi_F \sim 0.01$ ) compared with that obtained in cyclohexane ( $\phi_F \sim 0.13$ ). This effect has been  
 217 previously observed for GFT, where  $\phi_F$  decreases from  $\sim 0.19$  in cyclohexane to  $\sim 0.02$  within HSA,  
 218 and it is associated with quenching of LE states through photoinduced electron transfer from Tyr  
 219 and/or Trp. It is worth to mention that this is a dynamic process that lowers  $\tau_F$  values.(Tamarit et al.,  
 220 2021;Tamarit et al., 2022) With the aim of investigating this possibility for GFT-M2, fluorescence  
 221 measurements were performed in the non-polar solvent toluene in the presence of increasing amounts  
 222 of Tyr and Trp (due to solubility requirements, the *N*-acetyl methyl ester amino acid derivatives,  
 223 namely NAc-TyrMe or NAc-TrpMe, were used). Interestingly, fluorescence quenching of the LE  
 224 singlet state of the metabolite ( $^1$ GFT-M2\*) was indeed observed upon addition of Tyr or Trp (Figure  
 225 3); however, the process was found to be static in nature since the fluorescence lifetimes were hardly  
 226 affected. It is worth to mention that using either Tyr or Trp as quenchers, a new band with  $\lambda_{max} \sim 490$   
 227 nm arose at high amino acid concentrations (insets of Figure 3); this is attributed to emission from  
 228 phenolate-like species involving interaction between hydrogen-bonded GFT-M2 and Tyr (or Trp) in  
 229 the ground state. However, and as discussed above, these species have not been observed in the  
 230 supramolecular GFT-M2@HSA complex, since LE states predominate. Therefore, it would exist an  
 231 additional deactivation route for  $^1$ GFT-M2\* within the protein, which would be strongly affected by

232 the conformational arrangement of the metabolite in the binding sites (see the discussion on MD  
 233 simulations).



234

235 **FIGURE 3.** Fluorescence spectra of GFT-M2 after addition of increasing amounts of Tyr (A) or Trp  
 236 (B). All measurements were performed at metabolite:amino acid molar ratios of 1:50, 1:100, 1:150,  
 237 1:200, 1:250 and 1:300 after excitation at 340 nm in toluene. The concentration of GFT-M2 was  
 238 maintained constant at 10  $\mu$ M.

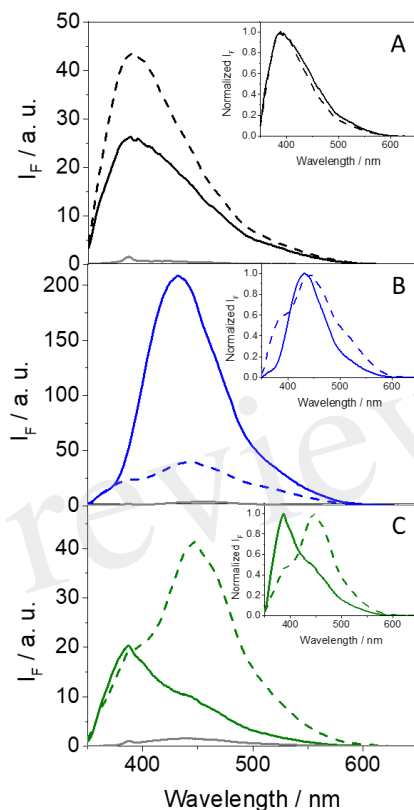
239 An additional point to address is the strength of interaction of the drug and its two metabolites within  
 240 HSA, since it is key for their transport to the specific targets and for their toxicological activity.  
 241 Although there are many analytical techniques to determine the binding constant ( $K_B$ ) between a drug  
 242 and a protein, fluorescence spectroscopy is a widely used one due to its high sensitivity and  
 243 selectivity. (Hirose, 2001; Vuignier et al., 2010; Vayá et al., 2014; Dos Santos Rodrigues et al., 2023)  
 244 In this context, there are different  $K_B$  values reported for GFT within HSA, which vary in the range of  
 245  $10^3 - 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ . (Li et al., 2006; Kabir et al., 2016; Wu et al., 2016; Domotor et al.,  
 246 2018; Tanzadehpanah et al., 2018; Tanzadehpanah et al., 2019) In view of this discrepancy, up to two-  
 247 orders of magnitude, we determined the binding constants for the drug and its two metabolites  
 248 within HSA by means of UV absorption and fluorescence spectroscopies. To this end, a modified  
 249 Scatchard analysis was performed (Supplementary Figures S6-S8). (Healy, 2007) The  $K_B$  values  
 250 obtained by the two techniques were very similar, with deviations between them lower than 10%; the  
 251 obtained data are summarized in Table 1. As it can be observed, the strength of interaction of the two  
 252 metabolites to HSA is slightly higher than that determined for the parent drug.

253 **TABLE 1.** Binding constants for GFT, GFT-M1 and GFT-M2 within HSA and HAG.

$K_B / \text{M}^{-1}$	HSA	HAG
<b>GFT</b>	$7.5 \times 10^4$	$1.2 \times 10^5$
<b>GFT-M1</b>	$1.2 \times 10^5$	$9.1 \times 10^4$
<b>GFT-M2</b>	$1.8 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$

254 A similar study was performed for HAG, since it is another important transport protein in human  
 255 plasma. In this context, fluorescence experiments were also performed at  $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ , were the  
 256 drug and/or its two metabolites are the only absorbing species (Supplementary Figure S9). As  
 257 expected, a noticeable fluorescence enhancement for either GFT, GFT-M1 and GFT-M2 was

258 observed upon binding with HAG (Figure 4). Job's plot analyses confirmed that 1:1 stoichiometry  
259 complexes are formed between the drug or its metabolites and HAG (Supplementary Figure S10).

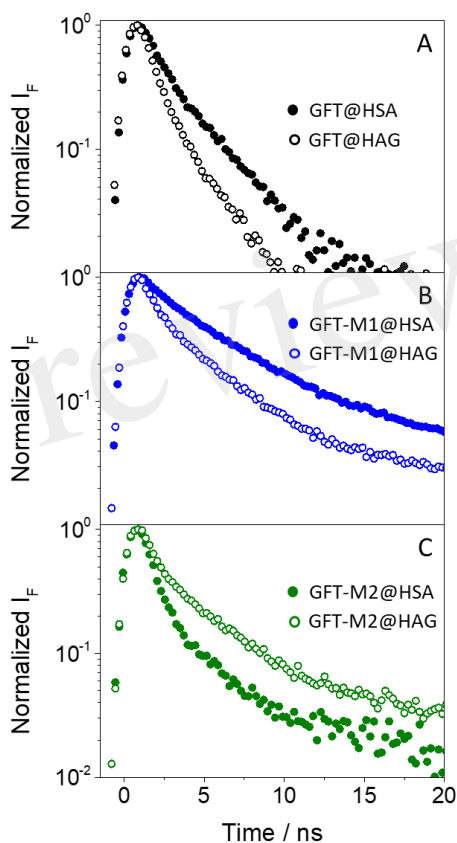


260

261 **FIGURE 4.** Fluorescence spectra at  $\lambda_{exc} = 340$  nm in PBS for (A) GFT (gray), GFT@HSA (solid  
262 black) and GFT@HAG (dashed black), (B) GFT-M1 (gray), GFT-M1@HSA (solid blue) and GFT-  
263 M1@HAG (dashed blue), and (C) GFT-M2 (gray), GFT-M2@HSA (solid green) and GFT-  
264 M2@HAG (dashed green). The insets show the normalized spectra. For ligand@protein complexes,  
265 solutions were at 1:1 molar ratio (10  $\mu$ M).

266 In the case of GFT, its fluorescence profile within HAG was very similar to that observed for  
267 HSA,(Tamarit et al., 2021) showing a maximum centered at *ca.* 390 nm and displaying slightly  
268 higher  $\phi_F$  (Figure 4A and Table 2). Accordingly, emission is again associated with LE states as the  
269 only excited species; this was further supported by time-resolved fluorescence measurements, since a  
270 one-exponential law was used to get a good fitting of the kinetic traces (Figure 5A). Likewise,  
271 comparable results were obtained for GFT-M1 bound to HSA and HAG; the fluorescence bands peak at  
272 *ca.* 432 and 442 nm, respectively (Figure 4B). This is in line with emission from phenolate-like  
273 excited states, which display longer lifetimes than LE (Figure 5B and Table 2). Interestingly, a  
274 shoulder at around 390 nm was detected for GFT-M1@HAG, which might be associated with  
275 emission from LE states to a lower extent than phenolate-like species. In fact, a two-exponential  
276 function was necessary to get a good fitting for the fluorescence kinetics, where the short component

277 (~ 0.5 ns) is associated to emission from LE states while the longer one (~ 3.1 ns) is assigned to  
 278 phenolate species (Figure 5B). A completely different photobehavior was observed for the protein-  
 279 bound GFT-M2. As explained above, emission from LE states predominates in HSA, whereas  
 280 phenolate-like species are mainly formed in HAG ( $\lambda_{\text{max}} \sim 446$  nm), although LE states also appears to  
 281 a much lower extent, since a shoulder at ~ 388 nm was also detected. These results are again  
 282 supported by time-resolved fluorescence measurements (Figure 5C), where a longer-lived component  
 283 assigned to phenolate-like species dominates the kinetics of GFT-M2@HAG.



284

285 **FIGURE 5.** Fluorescence decays for (A) GFT@HSA (solid black circles) and GFT@HAG (opened  
 286 black circles), (B) GFT-M1@HSA (solid blue circles) and GFT-M1@HAG (opened blue circles),  
 287 and (C) GFT-M2@HSA (solid green circles) and GFT-M2@HAG (opened green circles).  
 288 Measurements were performed at  $\lambda_{\text{exc}} = 340$  nm for ligand@protein solutions at 1:1 molar ratio (10  
 289  $\mu\text{M}$ ) in PBS.

290

291

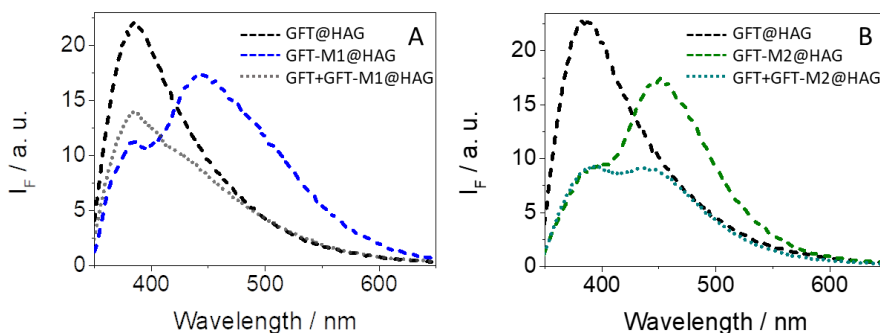
292

293 **TABLE 2.** Fluorescence properties of the protein-bound drug (or metabolite) complexes at  $\lambda_{\text{exc}} = 340$   
 294 nm in PBS.

	HSA			HAG		
	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$	$\phi_F$	$\tau_F / \text{ns}$	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$	$\phi_F$	$\tau_F / \text{ns}$
<b>GFT</b>	390 <sup>a</sup>	0.02 <sup>a</sup>	1.3 <sup>a</sup>	390	0.03	0.8
<b>GFT-M1</b>	432 <sup>b</sup>	0.15 <sup>b</sup>	2.5 <sup>b</sup>	442 (390) <sup>c</sup>	0.04	1.6 <sup>d</sup>
<b>GFT-M2</b>	388	0.01	1.0 <sup>d</sup>	446 (388) <sup>c</sup>	0.03	1.7 <sup>d</sup>

295 <sup>a</sup>Data from ref. 35. <sup>b</sup>Data from ref. 36. <sup>c</sup>Shoulders detected in the fluorescence spectra are shown  
 296 between brackets. A one-exponential function was used to fit all the decay traces, except for *d*, where  
 297 a mean lifetime was determined as  $\langle \tau_F \rangle = a_1 \tau_1 + a_2 \tau_2$ .

298 The strength of interactions of GFT and its two metabolites within HAG was also studied by means  
 299 of spectroscopic techniques (Supplementary Figures S11-13). The  $K_B$  values (Table 1) are on the  
 300 order of those obtained for HSA, and in the case of GFT, agree well with the reported data. (Li et al.,  
 301 2006) Competing interactions on mixtures containing the drug and a metabolite in the presence of  
 302 HAG confirmed the consistency of the determined binding constants. Hence, the emission profile of  
 303 GFT+GFT-M1 in the presence of HAG resembles that of GFT@HAG, in agreement with its higher  
 304  $K_B$  value (Figure 6A). By contrast, the fluorescence spectrum for GFT+GFT-M2 in the presence of  
 305 HAG might contain equal contributions from both GFT@HAG and GFT-M2@HAG (Figure 6B),  
 306 which agrees with the similar strength of interactions of the two supramolecular complexes ( $1.2 \times 10^5$   
 307 and  $1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , respectively).



308

309 **FIGURE 6.** Fluorescence spectra at  $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$  for (A) GFT@HAG (dashed black), GFT-  
 310 M1@HAG (dashed blue) and GFT+GFT-M1@HAG (dotted gray), and (B) GFT@HAG (dashed  
 311 black), GFT-M2@HAG (dashed green) and GFT+GFT-M2@HAG (dotted dark green). All mixtures  
 312 were at 1:1 molar ratio (10  $\mu\text{M}$ ) in PBS. For drug+metabolite/HAG, equimolar 1:1:1 mixtures were  
 313 used.

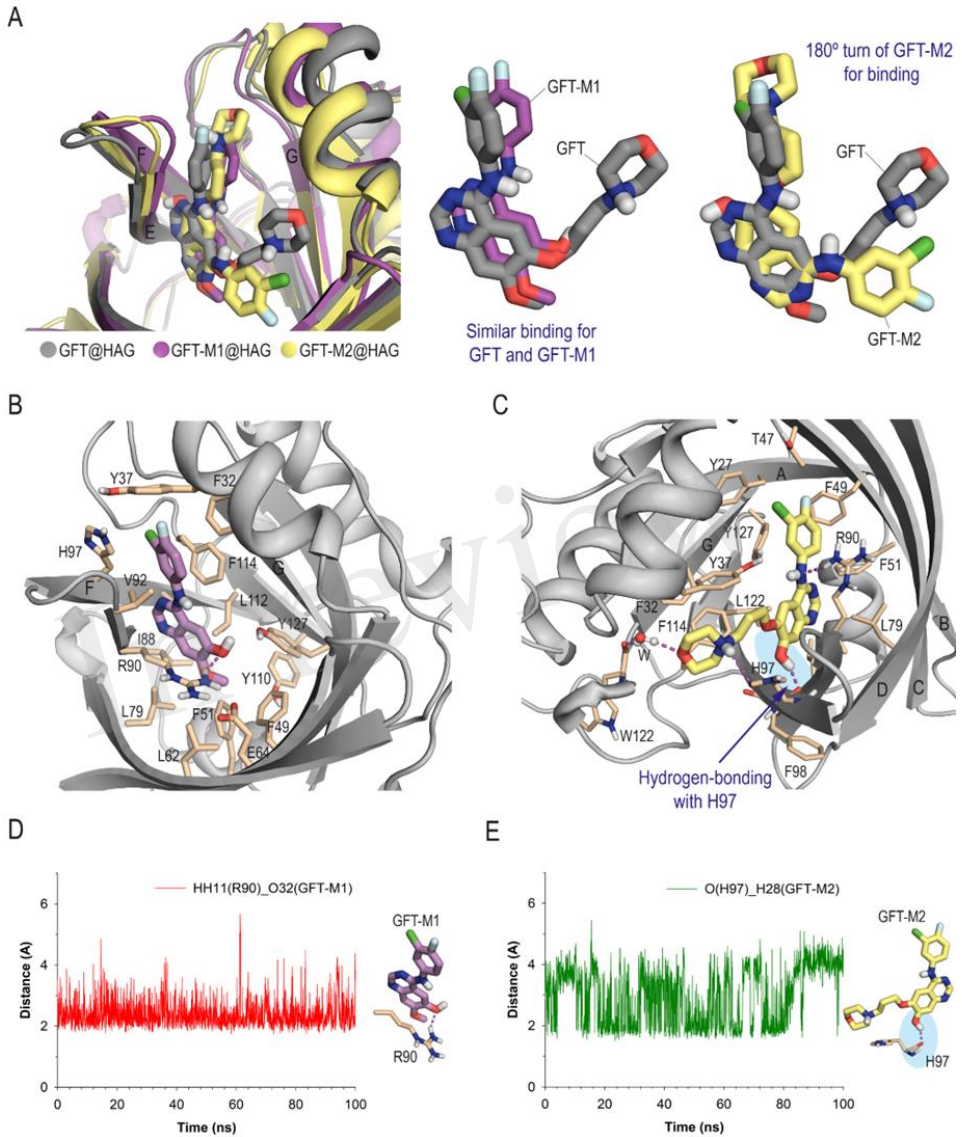
314 Moreover, competing interactions of the drug (or its metabolites) in a mixture containing the two  
 315 proteins are also in line with the  $K_B$  values obtained experimentally. In this context, the emission of  
 316 GFT in the presence of an equimolar mixture of the two proteins resembles that of GFT@HAG  
 317 (Supplementary Figure S14A), confirming its higher binding constant value. A similar conclusion

318 can be drawn for GFT-M1 and GFT-M2 in the presence of an equimolar mixture of HSA and HAG,  
319 where higher affinity to HSA was observed for the former, while similar affinity to either HSA or  
320 HAG was noticed for GFT-M2 (Supplementary Figures S14B and C, respectively).

321 The photobehavior herein discussed can justify the differences in the photosensitivity disorders  
322 previously observed by excitation of GFT, GFT-M1 and GFT-M2 in a biological media with UVA  
323 light.(El Ouardi et al., 2023) In this regard, GFT-M1 displays the highest fluorescence yield in the  
324 protein environment, in particular in the presence of HSA. Besides, the fluorescence lifetime  
325 observed within this protein was the longest one. This can explain the highest phototoxicity detected  
326 for GFT-M1. Accordingly, GFT is also phototoxic but to a lesser extent, in line with its lower  $\phi_F$   
327 value and shorter  $\tau_F$ , while GFT-M2 is much less phototoxic.(El Ouardi et al., 2023) Interestingly,  
328 since electron and proton transfer processes are expected to occur in the protein environment, the  
329 photosensitizing damage from either the drug and its two metabolites is consistent with the  
330 involvement of a type I mechanism.

331 To provide a more in-depth understanding of the molecular bases responsible for the distinct  
332 photobehavior of the GFT metabolites, GFT-M1 and GFT-M2, relay on the protein that transport  
333 them, their binding modes were studied *in silico*. To this end, docking studies were first performed  
334 using the GOLD program version 2021.3.0,(Jones et al., 1997) followed by MD simulation studies to  
335 provide a more realistic picture of the ligand arrangement upon binding. The protein coordinates of  
336 the reported wild-type structure of HAG (PDB ID 3KQ0) and of HSA in complex with myristic acid  
337 and hemin (PDB ID 1O9X) were used for these studies.(Zunszain et al., 2003;Schönfeld et al., 2008)  
338 The most plausible ligand@protein complexes obtained by docking were immersed in a truncated  
339 octahedron box of TIP3P water molecules and neutralized by addition of sodium ions, and then  
340 subjected to 100 ns of dynamic simulation using the molecular mechanics force field AMBER  
341 ff14SB and GAFF.(Case et al., 2021)

342 As stated above, HAG contains a single large and flexible cavity to bind drugs.(Kremer et al.,  
343 1988;Maruyama et al., 1990) The *in silico* results showed that GFT and its metabolites would be  
344 stable within the corresponding protein recognition sites, as revealed by the low rmsd (root-mean-  
345 square deviation) values obtained for the protein backbone and ligands during the whole simulation  
346 (Supplementary Figures S15 and S16). More importantly, the two metabolites showed markedly  
347 different binding behavior depending on the transport protein used when compared with the parent  
348 drug. Thus, the interaction of GFT-M2 with HAG has been found to be much different than those of  
349 GFT and GFT-M1, which would be quite similar among them (Figure 7A). For GFT and GFT-M1,  
350 the pyrimidine ring of the quinazoline core would be located close to  $\beta$ -sheets F and E, and the 3-  
351 chloro-4-fluorophenyl moiety would be placed between  $\beta$ -sheets F and G (Figure 7B). On the  
352 contrary, GFT-M2 would undergo a 180° turn for binding, thus placing the phenyl group pointing  
353 towards  $\beta$ -sheets A and B and the morpholinyl moiety between  $\beta$ -sheets F and G (Figure 7C). Under  
354 the latter arrangement, the phenolic proton in GFT-M2 would establish a hydrogen-bonding  
355 interaction with the main carbonyl group of residue H97, which showed to be stable during most of  
356 the simulation (Figure 7E). It was also observed that when this interaction is lost as result of the  
357 rotation of OH group, a similar hydrogen-bonding interaction with the main carbonyl group of  
358 residue F98 would be established. For GFT-M1, the interaction of one of the oxygen lone pair of its  
359 OH group with the guanidinium group of R90 (average value of 2.4 Å during 100 ns-simulation)  
360 would freeze the orientation of the phenolic proton towards the bulky water solvent (Figure 7D). As a  
361 result, no interactions by hydrogen-bonding between its phenolic proton and any residue of the  
362 protein were identified.



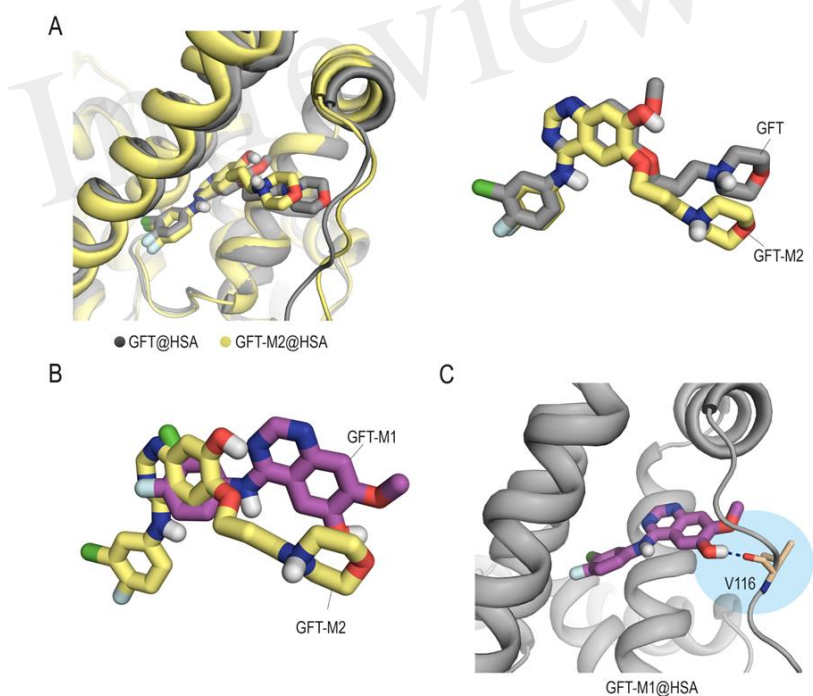
363

364 **FIGURE 7.** Binding mode of GFT and its metabolites with HAG obtained by MD simulation  
 365 studies. (A) Comparison of the GFT@HAG (gray), GFT-M1@HAG (magenta), GFT-M2@HAG  
 366 (yellow) binary complexes (snapshots after 90 ns, 90 ns and 80 ns, respectively, are shown) and  
 367 superposition of the arrangements of GFT and GFT-M1 and GFT and GFT-M2, which are shown in  
 368 sticks. Note how while GFT and GFT-M1 show a similar arrangement, GTF-M2 undergoes a 180°  
 369 turn for binding. (B,C) Detailed views of GFT-M1 (B) and GFT-M2 (C) binding modes. Snapshots  
 370 after 90 ns and 80 ns, respectively, are shown. (C) Detailed view of GFT-M2 binding mode.  
 371 Snapshot after 80 ns is shown. Hydrogen-bonding interactions between the ligand and protein



372 residues are shown as dashed lines (magenta). Note how the phenol moiety interacts by hydrogen-  
373 bonding with the main carbonyl group of H97 (blue shadow). A similar interaction is not observed  
374 for GFT-M1. (D,E) Variation of the relative distances between: (D) the phenol moiety (O atom) in  
375 GFT-M1 and the guanidinium group of R90 (HH11 atom) in the GFT-M1@HAG protein complex;  
376 (E) the phenol moiety (H atom) in GFT-M2 and the main carbonyl group of H97 (O atom) in the  
377 GFT-M2@HAG protein complex, during whole simulation. Average values of 2.9 Å and 2.4 Å,  
378 respectively.

379 Concerning HSA, it contains the major cavities (site I, II and III) where drugs can interact. (Sudlow et  
380 al., 1976; Zsila, 2013) Previous reports show that GFT binds to site III, (Tamarit et al., 2021) so that it  
381 was selected for these studies. Our computational studies revealed that unlike what happens with  
382 HAG, the interactions of GFT and its metabolites with site III (subdomain IB) of HSA does not  
383 follow the previous pattern. Thus, while GFT and GFT-M2 would achieve a similar arrangement  
384 (Figure 8A), GFT-M1 would be buried at the bottom of the pocket thanks to the lack of the  
385 morpholine moiety (Figure 8B). More importantly, this insertion into the cleft would be promoted by  
386 a hydrogen-bonding interaction between the phenolic proton in GFT-M1 and the main carbonyl  
387 group in residue V116 (Figure 8C). For GFT-M2, a similar interaction was not identified during the  
388 whole simulation.



389

390 **FIGURE 8.** Binding mode of GFT and its metabolites with HSA obtained by MD simulation studies.  
391 (A) Comparison of the binary GFT@HSA (gray) and GFT-M2@HSA (yellow) complexes and  
392 overlapping of the arrangements of GFT and GFT-M2, which are shown in sticks. Snapshots after  
393 100 ns are shown. (B) Superposition of the arrangements of GFT-M1 (magenta) and GFT-M2  
394 (yellow). (C) Close view of GFT-M1 binding mode with HSA. Snapshot taken after 90 ns of



395 simulation. Hydrogen-bonding interactions are shown as blue dashed lines. Contrary to what happens  
396 with GFT-M2, the phenolic proton in GFT-M1 establishes a hydrogen-bonding interaction with the  
397 protein (residue V116).

#### 398 **4 Conclusion**

399 The photobehavior of the anticancer drug GFT and its two photoactive metabolites GFT-M1 and  
400 GFT-M2 has been investigated in the presence of the most abundant transport proteins in human  
401 plasma, *i. e.* HSA and HAG. The strength of binding and the nature of the main transient species that  
402 are formed upon irradiation of the protein-bound drug (or metabolite) with UVA have been studied  
403 by means of spectroscopic techniques. In general, the protein strongly modulates the fate of the  
404 excited species that are formed in the confined biological environment. In this regard, excitation of  
405 GFT-M2@HSA at 340 nm leads mainly to formation of locally excited states, whereas phenolate-  
406 like species predominate in HAG. By contrast, a diverging behavior is observed for GFT-M1, which  
407 forms phenolate-like species as the only excited states in HSA, while locally excited states are also  
408 formed within HAG. As regards GFT, locally excited states are primarily formed in the two proteins.  
409 These results are supported by molecular dynamics simulations, which rationalize the variability  
410 detected in the photoinduced processes and the type of excited species formed in the protein cavities  
411 based on the differences in the ligand binding mode, the type of interactions with the protein, and the  
412 arrangement of key functional groups involved in the ligand structure. Taken together, the herein  
413 reported studies highlight the relevant role of the biomacromolecule microenvironment in the  
414 modulation of the photobiological properties of the ligand inherent to its chemical structure.

#### 415 **5 Conflict of Interest**

416 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial  
417 relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

#### 418 **6 Funding**

419 Grants PID2020-115010RB-I00 and PID2022-136963OB-I00 funded by  
420 MCIN/AEI/10.13039/501100011033, grant CIAICO/2021/061 funded by Conselleria d'Innovació,  
421 Universitats, Ciència i Societat Digital and grant AP2022-5 funded by Programa d'Accions  
422 Preparatòries UV-La Fe. Grants from the Xunta de Galicia [ED431C 2021/29 and the Centro singular  
423 de investigación de Galicia accreditation 2019-2022 (ED431G 2019/03), CG-B], and the European  
424 Regional Development Fund (ERDF).

#### 425 **7 Acknowledgments**

426 The Ministry of Science, Innovation and Universities of Spain, the Conselleria d'Innovació,  
427 Universitats, Ciència i Societat Digital, the University of Valencia, the Health Research Institute  
428 Hospital La Fe (IIS La Fe) and La Xunta de Galicia are gratefully acknowledged for financial  
429 support. All authors are grateful to the Centro de Supercomputación de Galicia (CESGA) for use of  
430 the Finis Terrae computer.

#### 431 **8 Data Availability Statement**

432 The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Materials,  
433 further inquiries can be directed to the corresponding authors.

434 **9 References**

- 435 Andreu, I., Lence, E., Gonzalez-Bello, C., Mayorga, C., Cuquerella, M.C., Vayá, I., and Miranda,  
436 M.A. (2020). Protein Binding of Lapatinib and Its N- and O-Dealkylated Metabolites Interrogated by  
437 Fluorescence, Ultrafast Spectroscopy and Molecular Dynamics Simulations. *Front. Pharmacol.* 11,  
438 576495.
- 439 Blakely, K.M., Drucker, A.M., and Rosen, C.F. (2019). Drug-Induced Photosensitivity-An Update:  
440 Culprit Drugs, Prevention and Management. *Drug Saf.* 42, 827-847.
- 441 Carter, D.C., and Ho, J.X. (1994). "Structure of serum albumin," in *Advances in Protein Chemistry*.  
442 (New York: Academic Press), 153-203.
- 443 Case, D.A., Aktulga, H.M., Belfon, K., Ben-Shalom, I.Y., Brozell, S.R., Cerutti, D.S., Cheatham,  
444 T.E., Cisneros, G.A., Cruzeiro, V.W.D., Darden, T.A., Duke, R.E., Giambasu, G., Gilson, M.K.,  
445 Gohlke, H., Goetz, A.W., Harris, R., Izadi, S., Izmailov, S.A., Jin, C., Kasavajhala, K., Kaymak,  
446 M.C., King, E., Kovalenko, A., Kurtzman, T., Lee, T.S., Legrand, S., Li, P., Lin, C., Liu, J., Luchko,  
447 T., Luo, R., Machado, M., Man, V., Manathunga, M., Merz, K.M., Miao, Y., Mikhailovskii, O.,  
448 Monard, G., Nguyen, H., O'hearn, K.A., Onufriev, A., Pan, F., Pantano, S., Qi, R., Rahnamoun, A.,  
449 Roe, D.R., Roitberg, A., Sagui, C., Schott-Verdugo, S., Shen, J., Simmerling, C.L., Skrynnikov,  
450 N.R., Smith, J., Swails, J., Walker, R.C., Wang, J., Wei, H., Wolf, R.M., Wu, X., Xue, Y., York,  
451 D.M., Zhao, S., and Kollman, P.A. (2021). "AMBER ". (San Francisco: University of California).
- 452 Cohen, M.H., Williams, G.A., Sridhara, R., Chen, G., and Pazdur, R. (2003). FDA Drug Approval  
453 Summary: Gefitinib (ZD1839) (Iressa®) Tablets. *Oncologist* 8, 303-306.
- 454 Cohen, P., Cross, D., and Janne, P.A. (2021). Kinase drug discovery 20 years after imatinib: progress  
455 and future directions. *Nat. Rev. Drug Discov.* 20, 551-569.
- 456 Delano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System; DeLano Scientific LLC: Palo Alto, CA,  
457 2008; <http://www.pymol.org/>, 2021 [Online]. [Accessed].
- 458 Domotor, O., Pelivan, K., Borics, A., Keppler, B.K., Kowol, C.R., and Enyedy, E.A. (2018).  
459 Comparative studies on the human serum albumin binding of the clinically approved EGFR  
460 inhibitors gefitinib, erlotinib, afatinib, osimertinib and the investigational inhibitor KP2187. *J.*  
461 *Pharm. Biomed. Anal.* 154, 321-331.
- 462 Dos Santos Rodrigues, F.H., Delgado, G.G., Santana Da Costa, T., and Tasic, L. (2023). Applications  
463 of fluorescence spectroscopy in protein conformational changes and intermolecular contacts. *BBA*  
464 *Adv.* 3, 100091.
- 465 El Ouardi, M., Tamarit, L., Vayá, I., Miranda, M.A., and Andreu, I. (2023). Cellular  
466 photo(geno)toxicity of gefitinib after biotransformation. *Front. Pharmacol.* 14.
- 467 Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani,  
468 G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H.P.,  
469 Izmaylov, A.F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J.L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda,  
470 R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T.,  
471 Montgomery, J.J.A., Peralta, J.E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J.J., Brothers, E., Kudin, K.N.,  
472 Staroverov, V.N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J.C., Iyengar,

473 S.S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J.M., Klene, M., Knox, J.E., Cross, J.B., Bakken, V.,  
474 Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R.E., Yazyev, O., Austin, A.J., Cammi, R.,  
475 Pomelli, C., Ochterski, J.W., Martin, R.L., Morokuma, K., Zakrzewski, V.G., Voth, G.A., Salvador,  
476 P., Dannenberg, J.J., Dapprich, S., Daniels, A.D., Farkas, Ö., Foresman, J.B., Ortiz, J.V., Cioslowski,  
477 J., and Fox, D.J. (2009). "Gaussian 09, Revision E.01". (Wallingford, CT).

478 Gambacorti-Passerini, C., Zucchetti, M., Russo, D., Frapolli, R., Verga, M., Bungaro, S., Tornaghi,  
479 L., Rossi, F., Pioltelli, P., Pogliani, E., Alberti, D., Corneo, G., and D'incalci, M. (2003). Alpha1 acid  
480 glycoprotein binds to imatinib (STI571) and substantially alters its pharmacokinetics in chronic  
481 myeloid leukemia patients. *Clin. Cancer Res.* 9, 625-632.

482 García-Láinez, G., Vayá, I., Marín, M.P., Miranda, M.A., and Andreu, I. (2021). In vitro assessment  
483 of the photo(genotoxicity associated with Lapatinib, a Tyrosine Kinase inhibitor. *Arch. Toxicol.* 95,  
484 169-178.

485 Hartmann, J.T., Haap, M., Kopp, H.-G., and Lipp, H.-P. (2009). Tyrosine Kinase Inhibitors – A  
486 Review on Pharmacology, Metabolism and Side Effects. *Curr. Drug Metab.* 10, 470-481.

487 Healy, E.F. (2007). Quantitative Determination of DNA-Ligand Binding Using Fluorescence  
488 Spectroscopy. *J. Chem. Educ.* 84, 1304-1307.

489 Hirose, K. (2001). A Practical Guide for the Determination of Binding Constants. *J. Incl. Phenom.*  
490 *Macrocycl. Chem.* 39, 193-209.

491 Holladay, J.W., Dewey, M.J., and Yoo, S.D. (1998). Pharmacokinetics and Antidepressant Activity  
492 of Fluoxetine in Transgenic Mice with Elevated Serum Alpha-1-Acid Glycoprotein Levels. *Drug*  
493 *Metab. Dispos.* 26, 20-24.

494 Huang, C.Y. (1982). Determination of binding stoichiometry by the continuous variation method: the  
495 Job plot. *Methods Enzymol.* 87, 509-525.

496 Huang, L., Jiang, S., and Shi, Y. (2020). Tyrosine kinase inhibitors for solid tumors in the past 20  
497 years (2001-2020). *J. Hematol. Oncol.* 13, 143.

498 Huang, Z., and Ung, T. (2013). Effect of Alpha-1-Acid Glycoprotein Binding on Pharmacokinetics  
499 and Pharmacodynamics. *Curr. Drug Metab.* 14, 226-238.

500 Jones, G., Willett, P., Glen, R.C., and Taylor, R. (1997). Development and Validation of a Genetic  
501 Algorithm for Flexible Docking. *J. Mol. Biol.* 267, 727-748.

502 Kabir, M.Z., Tee, W.-V., Mohamad, S.B., Alias, Z., and Tayyab, S. (2016). Interaction of an  
503 anticancer drug, gefitinib with human serum albumin: insights from fluorescence spectroscopy and  
504 computational modeling analysis. *RSC Adv.* 6, 91756-91767.

505 Kowalska, J., Rok, J., Rzepka, Z., and Wrzesniok, D. (2021). Drug-Induced Photosensitivity-From  
506 Light and Chemistry to Biological Reactions and Clinical Symptoms. *Pharmaceuticals* 14, 723.

507 Kragh-Hansen, U., Chuang, V.T.G., and Otagiri, M. (2002). Practical aspects of the ligand-binding  
508 and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 695-704.

- 509 Krasner, J. (1972). Drug-Protein Interaction. *Pediatr. Clin. North Am.* 19, 51-63.
- 510 Kremer, J.M., Wilting, J., and Janssen, L.H. (1988). Drug Binding to Human alpha-1-acid  
511 Glycoprotein in Health and Disease. *Pharmacol. Rev.* 40, 1-47.
- 512 Li, J., Brahmer, J., Messersmith, W., Hidalgo, M., and Baker, S.D. (2006). Binding of gefitinib, an  
513 inhibitor of epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase, to plasma proteins and blood cells: in  
514 vitro and in cancer patients. *Invest. New Drugs* 24, 291-297.
- 515 Lin, N.U., Carey, L.A., Liu, M.C., Younger, J., Come, S.E., Ewend, M., Harris, G.J., Bullitt, E., Van  
516 Den Abbeele, A.D., Henson, J.W., Li, X., Gelman, R., Burstein, H.J., Kasparian, E., Kirsch, D.G.,  
517 Crawford, A., Hochberg, F., and Winer, E.P. (2008). Phase II trial of lapatinib for brain metastases in  
518 patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 26,  
519 1993-1999.
- 520 Lin, N.U., Dieras, V., Paul, D., Lossignol, D., Christodoulou, C., Stemmler, H.J., Roche, H., Liu,  
521 M.C., Greil, R., Ciruelos, E., Loibl, S., Gori, S., Wardley, A., Yardley, D., Brufsky, A., Blum, J.L.,  
522 Rubin, S.D., Dharan, B., Steplewski, K., Zembryki, D., Oliva, C., Roychowdhury, D., Paoletti, P.,  
523 and Winer, E.P. (2009). Multicenter phase II study of lapatinib in patients with brain metastases from  
524 HER2-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 15, 1452-1459.
- 525 Lindup, W.E., and Orme, M.C. (1981). Clinical pharmacology: plasma protein binding of drugs. *Br.*  
526 *Med. J.* 282, 212-214.
- 527 Maruyama, T., Otagiri, M., and Takadate, A. (1990). Characterization of drug binding sites on  $\alpha$ 1-  
528 acid glycoprotein. *Chem. Pharm. Bull.* 38, 1688-1691.
- 529 Medina, P.J., and Goodin, S. (2008). Lapatinib: A Dual Inhibitor of Human Epidermal Growth  
530 Factor Receptor Tyrosine Kinases. *Clin. Ther.* 30, 1426-1447.
- 531 Montalti, M., Credi, A., Prodi, L., and Gandolfi, M.T. (2006). *Handbook of Photochemistry*. Boca  
532 Raton, FL: CRC Press, Taylor and Francis Group.
- 533 Monteiro, A.F., Rato, M., and Martins, C. (2016). Drug-induced photosensitivity: Photoallergic and  
534 phototoxic reactions. *Clin. Dermatol.* 34, 571-581.
- 535 Paez, J.G., Jänne, P.A., Lee, J.C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F.J.,  
536 Lindeman, N., Boggon, T.J., Naoki, K., Sasaki, H., Fujii, Y., Eck, M.J., Sellers, W.R., Johnson, B.E.,  
537 and Meyerson, M. (2004). EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to  
538 Gefitinib Therapy. *Science* 304, 1497-1500.
- 539 Pérez-Ruiz, R., Lence, E., Andreu, I., Limones-Herrero, D., González-Bello, C., Miranda, M.A., and  
540 Jiménez, M.C. (2017). A New Pathway for Protein Haptenation by beta-Lactams. *Chem. Eur. J.* 23,  
541 13986-13994.
- 542 Peters, T. (1995). "Ligand binding by albumin," in *All About Albumin - Biochemistry, Genetics, and*  
543 *Medical Applications*, ed. Elsevier. (San Diego: Academic Press), 76-132.

- 544 Pottier, C., Fresnais, M., Gilon, M., Jerusalem, G., Longuespee, R., and Sounni, N.E. (2020).  
545 Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer: Breakthrough and Challenges of Targeted Therapy. *Cancers*  
546 12, 731.
- 547 Quintero, B., and Miranda, M.A. (2000). Mechanisms of photosensitization induced by drugs: A  
548 general survey. *Ars. Pharmaceutica* 41, 27-46.
- 549 Schönfeld, D.L., Ravelli, R.B., Mueller, U., and Skerra, A. (2008). The 1.8-Å crystal structure of  
550 alpha1-acid glycoprotein (Orosomucoid) solved by UV RIP reveals the broad drug-binding activity  
551 of this human plasma lipocalin. *J. Mol. Biol.* 384, 393-405.
- 552 Selvam, T.P., and Kumar, P.V. (2011). Quinazoline Marketed drugs – A Review. *Res. Pharm.* 1, 1-  
553 21.
- 554 Solassol, I., Pinguet, F., and Quantin, X. (2019). FDA- and EMA-Approved Tyrosine Kinase  
555 Inhibitors in Advanced EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: Safety, Tolerability, Plasma  
556 Concentration Monitoring, and Management. *Biomolecules* 9.
- 557 Spitaleri, A., and Rocchia, W. (2019). "Molecular Dynamics-Based Approaches Describing Protein  
558 Binding," in *Biomolecular Simulations in Structure-Based Drug Discovery*, eds. F.L. Gervasio & V.  
559 Spiwok. (Weinheim, Germany: Wiley-VCH), 29-39.
- 560 Stein, K.R., and Scheinfeld, N.S. (2007). Drug-induced photoallergic and phototoxic reactions.  
561 *Expert Opin. Drug Saf.* 6, 431-443.
- 562 Sudlow, G., Birkett, D.J., and Wade, D.N. (1976). Further characterization of specific drug binding  
563 sites on human serum albumin. *Mol. Pharmacol.* 12, 1052-1061.
- 564 Tamarit, L., El Ouardi, M., Andreu, I., Vayá, I., and Miranda, M.A. (2021). Photoprocesses of the  
565 tyrosine kinase inhibitor gefitinib: from femtoseconds to microseconds and from solution to cells.  
566 *Chem. Sci.* 12, 12027-12035.
- 567 Tamarit, L., El Ouardi, M., Lence, E., Andreu, I., González-Bello, C., Vayá, I., and Miranda, M.A.  
568 (2022). Switching from ultrafast electron transfer to proton transfer in excited drug–protein  
569 complexes upon biotransformation. *Chem. Sci.* 13, 9644-9654.
- 570 Tanzadehpanah, H., Mahaki, H., Moghadam, N.H., Salehzadeh, S., Rajabi, O., Najafi, R., Amini, R.,  
571 and Saidijam, M. (2019). Binding site identification of anticancer drug gefitinib to HSA and DNA in  
572 the presence of five different probes. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 37, 823-836.
- 573 Tanzadehpanah, H., Mahaki, H., Moradi, M., Afshar, S., Rajabi, O., Najafi, R., Amini, R., and  
574 Saidijam, M. (2018). Human serum albumin binding and synergistic effects of gefitinib in  
575 combination with regorafenib on colorectal cancer cell lines. *Colorect. Cancer* 7.
- 576 Trainor, G.L. (2007). The importance of plasma protein binding in drug discovery. *Expert Opin.*  
577 *Drug Discov.* 2, 51-64.
- 578 Vayá, I., Andreu, I., Lence, E., González-Bello, C., Cuquerella, M.C., Navarrete-Miguel, M., Roca-  
579 Sanjuan, D., and Miranda, M.A. (2020). Characterization of Locally Excited and Charge-Transfer

- 580 States of the Anticancer Drug Lapatinib by Ultrafast Spectroscopy and Computational Studies.  
581 Chem. Eur. J. 26, 15922-15930.
- 582 Vayá, I., Lhiaubet-Vallet, V., Jimenez, M.C., and Miranda, M.A. (2014). Photoactive assemblies of  
583 organic compounds and biomolecules: drug-protein supramolecular systems. Chem. Soc. Rev. 43,  
584 4102-4122.
- 585 Vuignier, K., Schappler, J., Veuthey, J.L., Carrupt, P.A., and Martel, S. (2010). Drug-protein  
586 binding: a critical review of analytical tools. Anal. Bioanal. Chem. 398, 53-66.
- 587 Wu, D., Yan, J., Sun, P., Xu, K., Li, S., Yang, H., and Li, H. (2016). Comparative analysis of the  
588 interaction of capecitabine and gefitinib with human serum albumin using (19)F nuclear magnetic  
589 resonance-based approach. J. Pharm. Biomed. Anal. 129, 15-20.
- 590 Yoo, S.D., Holladay, J.W., Fincher, T.K., Baumann, H., and Dewey, M., J. (1996). Altered  
591 disposition and antidepressant activity of imipramine in transgenic mice with elevated alpha-1-acid  
592 glycoprotein. J. Pharmacol. Exp. Ther. 276, 918-922.
- 593 Zsila, F. (2013). Subdomain IB is the third major drug binding region of human serum albumin:  
594 toward the three-sites model. Mol. Pharmaceutics 10, 1668-1682.
- 595 Zunszain, P.A., Ghuman, J., Komatsu, T., Tsuchida, E., and Curry, S. (2003). Crystal structural  
596 analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. BMC Struct. Biol. 3, 6.









## Anexo II. Técnicas espectroscópicas y metodología





En esta tesis doctoral se han empleado distintas técnicas espectroscópicas para estudiar la fotorreactividad de gefitinib y sus principales metabolitos en distintos medios; entre ellas, conviene destacar la espectroscopía de absorción UV-visible, la espectroscopía de fluorescencia en estado estacionario y de resolución temporal, la espectroscopía de fosforescencia y la de absorción transitoria a escala de femtosegundos (*femtosecond transient absorption*, FTA), así como a escala de microsegundos mediante el uso de la técnica de fotólisis de destello láser (*laser flash photolysis*, LFP).

A continuación, se explica con detalle cada una de las técnicas espectroscópicas utilizadas, así como algunas metodologías comunes que se han seguido para la realización de los distintos experimentos y determinación de diversos parámetros fotofísicos.

## II.1. Espectroscopía de absorción UV-Vis

Los espectros de absorción UV-Vis en estado estacionario se registraron con un espectrofotómetro JASCO V-630. Para ello, se utilizaron cubetas de cuarzo de paso óptico de 1 cm, con capacidad para 4 mL de muestra. Se registró, en todos los casos, la transmitancia del disolvente correspondiente como blanco antes de medir cada muestra.

En el caso de las disoluciones en las que hubo problemas de solubilidad (*i. e.* ciclohexano y PBS), las muestras se filtraron con filtros de PTFE (diámetro de poro: 0.45  $\mu\text{m}$ ) con el fin de eliminar posibles señales derivadas de agregados o restos de compuesto no disuelto.

## II. II. Espectroscopía de fluorescencia

La espectroscopía de fluorescencia es una técnica con gran sensibilidad que permite obtener información acerca de los estados excitados, generalmente de naturaleza singlete, de moléculas orgánicas. En este trabajo, se han realizado medidas de fluorescencia tanto en estado estacionario como resueltas en el tiempo.

El equipo que se utilizó para las medidas en estado estacionario es un espectrofotómetro de fluorescencia JASCO FP-8500. Este equipo está provisto con una lámpara de xenón para generar el haz de excitación y un monocromador que permite seleccionar la longitud de onda (340 nm). La emisión se registra en perpendicular a la excitación para evitar interferencias derivadas del propio haz de excitación, y se detecta por un fotomultiplicador que monitoriza la señal en la pantalla del ordenador.

En el caso de la fluorescencia resuelta en el tiempo, se utilizó un espectrofotómetro EasyLife X. El equipo está dotado de un soporte para cubetas con un módulo peltier automatizado para controlar la temperatura de registro, una fuente excitación compuestas por un módulo LED de luz monocromática pulsada, y un detector de resolución temporal situado perpendicularmente a la fuente de excitación. Las medidas se registraron a 25 °C empleando una fuente de excitación LED de 340 nm. Se utilizó un filtro WG370 para eliminar las señales por debajo de 370 nm y, así, evitar interferencias de la propia excitación en la señal registrada. Los datos obtenidos se trataron mediante un procedimiento de deconvolución no lineal ajustados a una ecuación exponencial (ecuación II.1) donde  $F(t)$  es la fluorescencia a tiempo  $t$ , donde  $a_i$  y  $\tau_i$  son el

coeficiente preexponencial y el tiempo de vida media, respectivamente, correspondientes para cada término  $i$  del ajuste:

$$F(t) = \sum a_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (\text{II. I})$$

En algunos casos, el perfil cinético no se ajusta correctamente haciendo uso de un ajuste monoexponencial, sino que es necesario ajustar una ecuación multiexponencial de orden 2 (o superior), obteniéndose dos tiempos de vida distintos. En los casos donde ha sido necesario, se ha obtenido el valor de tiempo de vida media  $\langle \tau_F \rangle$  según la ecuación II.II, donde  $\tau_1$  y  $\tau_2$  son los tiempos de vida media calculados para cada especie, siendo  $a_1$  y  $a_2$  los valores preexponenciales de cada término:

$$\langle \tau_F \rangle = a_1 \cdot \tau_1 + a_2 \cdot \tau_2 \quad (\text{II. II})$$

Las medidas en estado estacionario y de resolución temporal se realizaron con cubetas de cuarzo de 1 cm × 1 cm de paso de luz con capacidad para un volumen total de muestra de 4 mL. La absorbancia de las muestras se mantuvo en torno a 0.1 a la longitud de onda de excitación (340 nm) para evitar el efecto filtro interno, como son las reabsorciones. Para las medidas de fluorescencia en matriz sólida, se utilizaron tubos de cuarzo de 5 mm de diámetro sumergidos en nitrógeno líquido (77 K) para formar los cristales sólidos. En este caso, la absorbancia de las muestras se mantuvo alrededor de 0.5 a  $\lambda_{\text{exc}} = 340$  nm.

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia ( $\phi_F$ ) se han calculado haciendo uso de la ecuación II.III, tomando como referencia una disolución de antraceno en etanol.<sup>1</sup>

$$\phi_F = \phi_{F\_ref} \frac{A}{A_{ref}} \cdot \frac{Abs_{ref}}{Abs} \cdot \left( \frac{n}{n_{ref}} \right)^2 \quad (\text{II. III})$$

Donde  $A$  y  $A_{ref}$  son las áreas de los espectros de emisión de la muestra bajo estudio y de la referencia, respectivamente;  $Abs$  y  $Abs_{ref}$  son la absorbancia de la muestra y de la referencia, y  $n$  y  $n_{ref}$  son el índice de refracción del disolvente donde está disuelta la muestra y la referencia, respectivamente.

Las energías del primer estado excitado singlete se han calculado a partir de los espectros de emisión obtenidos tras excitar a 340 nm, y los espectros de excitación registrados a la longitud de onda correspondiente al máximo del espectro de emisión. Así pues, con el valor de la longitud de onda de la intersección ( $\lambda_{int}$ ) entre ambos espectros normalizados, se aplica la ecuación de Planck (ecuación II.IV), donde  $N_A$  es el número de Avogadro ( $6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ),  $h$  es la constante de Planck ( $6.63 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$ ) y  $c$  es la velocidad de la luz en el vacío ( $3 \times 10^8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ ):

$$E \left( \frac{\text{kcal}}{\text{mol}} \right) = \frac{N_A}{4184} \cdot h \cdot \frac{c}{\lambda_{int}} \quad (\text{II. IV})$$

### II. III. Espectroscopía de fosforescencia

Los espectros de fosforescencia se registraron mediante un espectrofotómetro *Photon Technology International* (PTI, modelo TM-2/2003) equipado con una lámpara pulsada de xenón de tiempo resuelto. Para registrar las medidas se aplicó un tiempo de retardo de 0.5 ms para evitar así obtener señal proveniente de la fluorescencia.

Las medidas se llevaron a cabo principalmente en etanol o ciclohexano. Las muestras se prepararon de la siguiente manera: la disolución problema se introdujo en un tubo de cuarzo de 5 mm de diámetro, y se enfrió a 77 K introduciendo el tubo en un *dewar* de cuarzo con nitrógeno líquido. Una vez formado el cristal, se realizaron las medidas a  $\lambda_{exc} = 340$

nm. Las muestras se prepararon con una absorción de  $\sim 0.6$  a dicha longitud de onda de excitación.

## II. IV. Espectroscopía de absorción transitoria

La espectroscopía de absorción transitoria permite detectar incrementos de absorbancia de las especies generadas en los estados excitados. Para ello, se utiliza un láser pulsado (en inglés *pump*) como fuente de excitación y otro denominado sonda (en inglés *probe*), el cual se utiliza para interrogar la muestra recién excitada y así poder medir su absorción transitoria. En esta tesis se han utilizado dos equipos distintos para realizar este tipo de medidas: el equipo de absorción transitoria a escala de femtosegundos (FTA) y el equipo de fotólisis de destello láser (LFP).

La técnica FTA es extremadamente sensible y permite estudiar los procesos fotofísicos ultrarrápidos que ocurren tras la excitación, tales como el cruce intersistema, la transferencia de energía y/o electrónica o la transferencia de protón fotoinducida. Asimismo, esta técnica también permite la detección instantánea de las especies transitorias que se generan tras irradiar una molécula orgánica, como puede ser la absorción singlete-singlete, la formación de radicales singlete (o triplete) y/o de estados excitados triplete, etc.<sup>2-4</sup> El equipo que se ha utilizado en esta tesis consta de un sistema *pump-probe*. La fuente de excitación láser genera pulsos centrados en 800 nm, con un tiempo de vida media de unos 100 fs por pulso y 1 mJ de energía. Seguidamente, el haz generado se divide en dos haces iguales que se utilizarán posteriormente como haz de excitación y como sonda de interrogación. Por una parte, el haz de excitación se dirige a un amplificador paramétrico óptico que permite su modulación a cualquier longitud de onda; en nuestro caso, pasa a ser de 330 nm. A

continuación, el haz pasa por un interruptor electrónico (*chopper*) antes de dirigirse hacia la celda rotatoria donde se encuentra la muestra en disolución. La celda utilizada es de cuarzo, de forma circular, con un paso óptico de 1 mm. Por otra parte, el haz de 800 nm se dirige hacia una línea de retardo óptico (*delay line*) variable de 8 ns, la cual se controla con el ordenador. A continuación, el haz pasa por un cristal giratorio de CaF<sub>2</sub>, generándose un haz de luz blanca. Este haz se divide a su vez en dos partes exactamente iguales para obtener los haces de sonda y referencia que inciden sobre la celda rotatoria que interrogan la muestra. Tras esta celda, se sitúa el espectrómetro, controlado por ordenador, para medir las señales y obtener los espectros de absorción transitoria, de los que se obtendrán los perfiles cinéticos tras la acumulación de numerosos espectros a distintos tiempos de registro. Los datos obtenidos se han tratado con el programa ExciPro, donde, para cada muestra, se ha eliminado la señal que proviene del disolvente (*chirp*). Posteriormente, los resultados obtenidos tras realizar dicha corrección, se han exportado a archivos ".txt" para poder tratarlos con el programa Origin, y poder obtener los espectros de absorción, así como los perfiles cinéticos. Los tiempos de vida de las especies transitorias detectadas se han ajustado haciendo uso de una función multiexponencial siguiendo el algoritmo iterativo de Levenberg-Marquardt (ecuación II.V):

$$F(t, \lambda) \sum_{i=1}^n a_i(\lambda) \cdot e^{\left(-\frac{t}{\tau_i}\right)} + y_0 \quad (II.V)$$

Donde F es la función que depende del tiempo  $t$  del eje temporal a la longitud de onda registrada  $\lambda$ ,  $a_i$  y  $\tau_i$  son el coeficiente preexponencial y el tiempo de vida media y  $y_0$  es la ordenada en el origen. En cuanto a los parámetros experimentales utilizados, la potencia del haz de excitación se



estableció en 180  $\mu\text{W}$ , condiciones en las que la fotodegradación de las muestras fue inferior al 5 %. La concentración de las muestras se fijó en torno a 100  $\mu\text{M}$ , ya que en estas condiciones se obtienen absorbancias *ca.* 0.8 a 330 nm, que son las adecuadas para obtener intensidades de señal óptimas. En vista de que la concentración utilizada es bastante elevada, en nuestro caso, y en ciertas ocasiones, se ve limitada la posibilidad de hacer medidas en disolventes apolares debido a problemas de solubilidad.

Las medidas de LFP se realizaron utilizando un láser pulsado de Nd:YAG L52137 V LOTIS TII a 355 nm. Los pulsos generados por el láser tienen un tiempo de vida aproximado de 10 ns. En nuestro caso, realizamos las medidas con una energía de *ca.* 12 mJ por pulso. El sistema contiene un monocromador 77250 Oriel y un osciloscopio DP04054 Tektronex el cual envía la señal a un ordenador. Las medidas se realizaron con cubetas de cuarzo de 1 cm  $\times$  1 cm de paso de luz, con una capacidad de 4 mL. Todas las medidas de LFP se llevaron a cabo a temperatura ambiente, con absorbancias *ca.* 0.2 a la longitud de onda de excitación. Las medidas llevadas a cabo en atmósfera inerte de  $\text{N}_2$  se realizaron burbujeando las disoluciones con  $\text{N}_2$  durante 25 min. En todos los casos, se realizaron controles para comprobar que la degradación de las muestras tras su irradiación era inferior al 5 %.

