



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Upconverting nanovesicles for the activation of ruthenium anti-cancer prodrugs with red light

Askes, S.H.C.

Citation

Askes, S. H. C. (2016, November 24). *Upconverting nanovesicles for the activation of ruthenium anti-cancer prodrugs with red light*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/44378>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/44378>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/44378> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Askes, S.H.C.

Title: Converting nanovesicles for the activation of ruthenium anti-cancer prodrugs with red light

Issue Date: 2016-11-24

Samenvatting in het Nederlands

Inleiding

Chemotherapie is een van de voornaamste therapieën om kanker te genezen. De huidige chemotherapeutische geneesmiddelen die goedgekeurd zijn voor klinische toepassing veroorzaken echter ernstige bijwerkingen in patiënten omdat de drugs systemisch actief zijn in het lichaam en daardoor ook gezond weefsel aantasten. Een veelbelovende manier om het probleem van systemische giftigheid te omzeilen is het gebruik van lichtactieveerbare “prodrugs” in een therapie genaamd lichtgeactiveerde chemotherapie (PACT): een inactieve voorloper van het geneesmiddel wordt in het lichaam geïntroduceerd en wordt alleen in de tumor omgezet naar de giftige vorm van het geneesmiddel door het kankerweefsel te bestralen met zichtbaar licht. Op deze manier kan het gebruik van licht zorgen voor een uitstekende controle over waar en wanneer de prodrug geactiveerd wordt. Veelbelovende moleculen voor toepassing in PACT zijn lichtgevoelige ruthenium(II)-polypyridylcomplexen met een ligand dat met licht afgesplitst kan worden (Hoofdstuk 1). Wanneer zulke verbindingen worden bestraald met licht, wordt het lichtafsplitsbare ligand vervangen door een zwakgebonden watermolecuul. Vervolgens kan het geactiveerde complex interactie aangaan met diverse biomoleculen aanwezig in het menselijk lichaam door het vervangen van het waterligand met stikstof of zwavelrijke liganden, zoals DNA-baseparen of cysteïneresiduen in eiwitten, wat uiteindelijk kan leiden tot celdood. Het grote voordeel van dit soort verbindingen is dat de giftigheid niet afhangt van de aanwezigheid van zuurstof, in tegenstelling tot fotodynamische therapie (PDT) wat werkt door reactieve zuurstofdeeltjes (ROS) te genereren. Het gebruik van lichtactieveerbare Ru complexen kan dus geschikt zijn voor het behandelen van tumorweefsel waarvoor PDT niet effectief is.

De meeste Ru(II)-polypyridylcomplexen absorberen echter alleen blauw tot groen licht, wat slechts tot ongeveer een millimeter in menselijk weefsel doordringt. Idealiter gebruikt men rood tot nabij-infrarood licht, wat tot wel een centimeter doordringt: daardoor wordt dit deel van het lichtspectrum ook wel het “fototherapeutische venster” genoemd. Om de activatiegolflengte van Ru(II)-polypyridylcomplexen naar het fototherapeutische venster te verschuiven, wordt in dit proefschrift voorgesteld om “lichtopwaardering” te

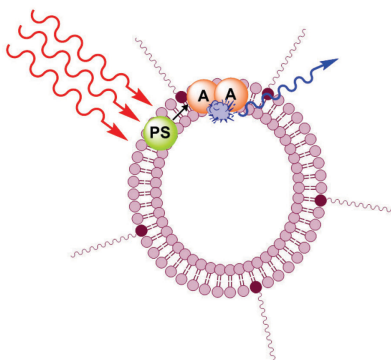
Samenvatting in het Nederlands

gebruiken om laag-energetisch licht, zoals rood of nabij-infrarood licht, om te zetten naar hoog-energetisch licht, zoals blauw licht. Praktisch gezien betekent dit dat de tumor wordt bestraald met rood tot nabij-infrarood licht, wat lokaal wordt opgewaardeerd naar blauw licht, waarmee de prodrug kan worden geactiveerd. Onder de verscheidene vormen van lichtopwaardering is “triplet-triplet annihilatie upconversie” (TTA-UC) verkozen als meest veelbelovende methode omdat het gerealiseerd kan worden bij lage bestralingsintensiteit en met hoge efficiëntie.

TTA-UC is gebaseerd op het samenspel van fotosensibilisator en annihilator kleurstoffen, zoals als volgt beschreven (zie ook Hoofdstuk 2). De fotosensibilisator absorbeert het laag-energetische licht, waarna intersysteemkruising leidt tot het molecuul in een langlevende triplet-toestand. Wanneer deze triplet-fotosensibilisator botst met een annihilatormolecuul, wordt de triplet-toestand overgedragen aan de annihilator door middel van triplet-triplet energie overdracht (TTET); een opeenvolging van dit TTET proces zorgt voor een concentratieopbouw van langlevende triplet-toestand annihilatormoleculen. De botsing van twee triplet-toestand annihilatormoleculen resulteert vervolgens in triplet-triplet annihilatie (TTA), waarbij één van de annihilatormoleculen vertrekt met de gecombineerde energie van beide triplet-toestanden en een hoog-energetische aangeslagen singlet-toestand bereikt. Deze singlet-toestand annihilator keert vervolgens terug naar de grondtoestand door uitstraling van een hoog-energetisch foton, waarbij de licht opwaardering tot stand is gebracht. In dit proefschrift wordt voorgesteld om rood-naar-blauw TTA-UC te gebruiken om een licht-gevoelig Ru(II)-polypyridylcomplex te activeren door de fotosensibilisator, annihilator, en Ru(II)-complex gezamenlijk te doteren in een nano-geneesmiddelafgiftesysteem zoals liposomen of polymeersomen. Dit heeft twee belangrijke voordelen: aan de ene kant zorgt deze supramoleculaire benadering voor een hogere selectiviteit voor tumoren door gebruik te maken van het feit dat het vaatstelsel van tumoren van nature meer doordringbaar is dan normale bloedvaten en tumoren geen lymfesysteem heeft (EPR effect). Aan de andere kant garandeert het gebruik van een nanodeeltje dat de lichtopwaardering plaatsvindt in nabijheid van de Ru(II)-prodrug.

TTA-UC in liposomen en polymeersomen

Zoals beschreven in Hoofdstuk 3 zijn met succes liposomen vervaardigd die in staat zijn blauwe fotonen te genereren uit groen of rood licht door middel van TTA-UC met twee verschillende kleurstofparen (Figuur S.1). De lichtopwaarderings-efficiëntie in liposomen was hoog en zeer vergelijkbaar met dat in organisch oplosmiddel. Om te onderzoeken waar de lichtopwaarderings plaatsvond, werden rood-naar-blauw opwaarderende “giant vesicles” (GUVs) vervaardigd en gefotografeerd door middel van lichtopwaarderings luminescentie microscopie, zoals beschreven in Hoofdstuk 5. De resultaten laten zien dat TTA-UC plaatsvond in de lipide dubbellaag van de GUVs en de hoge kwaliteit en stabiliteit van de afbeeldingen gaf gelegenheid tot het 3D-reconstrueren van de lichtopwaarderende GUVs. Omdat uiteindelijk de liposomen functioneel behoren te zijn bij menselijke lichaamstemperatuur (37 °C), werd de temperatuur-afhankelijkheid van TTA-UC in liposomen getest in een reeks van neutrale fosfolipide liposomen, waarvan de resultaten beschreven zijn in Hoofdstuk 6. Er werd vastgesteld dat de TTA-UC-intensiteit rond de hoofdtransitietemperatuur (T_m) maximaliseerde. Dit werd verklaard door het feit dat de moleculaire bewegingsvrijheid van de TTA-UC-kleurstoffen toeneemt met hogere temperatuur tot T_m , en daarmee TTA-UC-efficiëntie, terwijl bij nog hogere temperatuur het uitdoven van de fotosensibilisator resulteerde in een afname van TTA-UC-intensiteit boven T_m . De TTA-UC-efficiëntie bij 37 °C in DOPC, DLPC en DMPC liposomen was zeer vergelijkbaar. TTA-UC kan dus in het algemeen gerealiseerd worden in liposomen en de fosfolipide kan vrij worden gekozen om de liposoomformulering te optimaliseren wat betreft stabiliteit in medium, biologische compatibiliteit, verwijdering uit de bloedbaan en functionalisatie van het deeltjesoppervlakte.

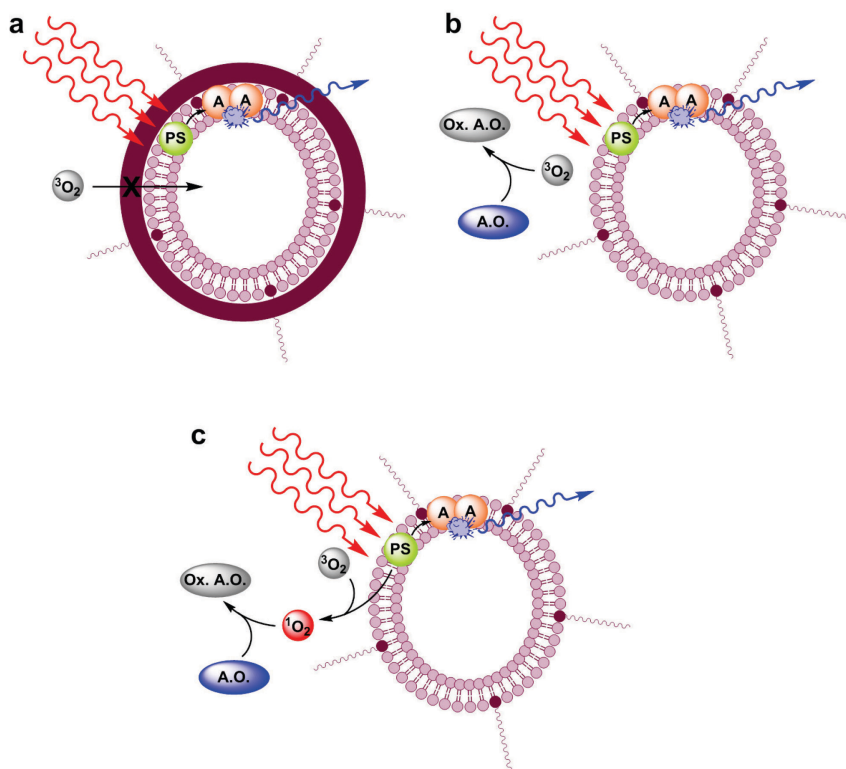


Figuur S.1. TTA-UC in liposomen met een fotosensibilisator (PS) en annihilator-kleurstof (A).

Samenvatting in het Nederlands

Om op deze resultaten voort te bouwen was het belangrijk om vast te stellen of TTA-UC kon plaatsvinden in levende cellen. Inderdaad is vastgesteld dat lichtopwaarderende liposomen door kankercellen werden opgenomen en dat de rood-naar-blauwe opwaardering kon worden waargenomen en gefotografeerd onder zuurstofarme condities, zoals beschreven in Hoofdstuk 7 en 8. De liposomen waren gelokaliseerd in endosomen en lysosomen en werden binnen 24 uur na opname door de cellen afgebroken. De lichtopwaardering verbleekte echter binnen een aantal seconden en de intensiteit was erg laag door uitdoving door de aanwezigheid van zuurstof in de cellen. Zoals beschreven in Hoofdstuk 8 werd deze zuurstofgevoeligheid verminderd door de cellen ook te behandelen met een biologisch relevante hoeveelheid glutathion en L-ascorbinezuur waardoor de TTA-UC-intensiteit sterk verhoogd werd. Daarnaast werd vastgesteld dat de lichtopwaarderende liposomen niet toxisch waren in het donker en onder bestraling met rood licht; er werd geen PDT effect waargenomen ten gevolge van de singlet-toestand zuurstof die werd gegenereerd door de fotosensibilisator.

Afgezien van liposomen werd rood-naar-blauw TTA-UC ook gerealiseerd in het membraan van polymeersomen, die zelf-geassembleerd waren uit polyisobutyleen-polyethyleenglycol blokkopolymere, zoals beschreven in Hoofdstuk 9. Alhoewel de rood-naar-blauw opwaardering enigszins minder efficiënt was dan in liposomen, werden de polymeersomen sneller opgenomen door levende cellen. Vervolgens konden de lichtopwaarderende polymeersomen gefotografeerd worden in de levende cellen, terwijl de toevoeging van glutathion en L-ascorbinezuur de *in vitro* prestaties sterk verbeterde. In vergelijking met liposomen kan het sterke rubberachtige membraan van polymeersomen beter bestandig zijn tegen afbraak door cellen of in het spijsverteringskanaal van zoogdieren, wat diverse mogelijkheden biedt voor toepassingen zoals medicijnafgifte. Alles samengenomen vertegenwoordigt TTA-UC in liposomen en polymeersomen interessante mogelijkheden in luminescentie biofotografie, omdat auto-fluorescentie en lichtbeschadiging van cellen en weefsel effectief worden voorkomen.



Figuur S.2. Cartoon ter illustratie van de drie verschillende strategieën die zijn nagestreefd in dit proefschrift om de zuurstofgevoeligheid van TTA-UC in nanodeeltjes te verlagen. a) Coating van het nanodeeltje met een materiaal als barrière voor zuurstof. b) Toevoeging van een antioxidant (A.O.) die reageert met grondtoestand zuurstof, wat leidt tot een geoxideerde antioxidant (Ox. A.O.). c) Toevoeging van een antioxidant die reageert met aangeslagen singlet-toestand zuurstof: wanneer de fotosensibilisator aangeslagen wordt ontstaat singlet-zuurstof, wat reageert met de antioxidant en leidt tot een zuurstofarme omgeving.

Zuurstofgevoeligheid van TTA-UC

Het mechanisme van TTA-UC hangt sterk af van langlevende triplet-toestand moleculen, die sterk kunnen worden uitgedoofd door zuurstof. Deze uitdoving leidt tot zeer lage TTA-UC-efficiëntie in aanwezigheid van zuurstof; in de literatuur zijn er tot op heden nog maar nauwelijks manieren gerapporteerd om dit probleem te verhelpen. Inderdaad werd tijdens het eerste werk voor Hoofdstuk 3 gerealiseerd dat TTA-UC in liposomen alleen goed werkte wanneer de oplossingen strikt zuurstofvrij waren gemaakt door een argonstroom door de oplossing te borrelen. Om dit grote nadeel tegen te gaan werden in opvolgende experimenten drie strategieën nagestreefd om de zuurstofgevoeligheid van TTA-UC in nanodeeltjes te verlagen (Figuur S.2). De eerste strategie was het aanbrengen van een zuurstof-ondoordringbare laag

Samenvatting in het Nederlands

rondom liposomen (Figuur S.2a). In Hoofdstuk 7 wordt beschreven hoe een nanometer-dikke (organo)silica-coating werd aangebracht rondom lichtopwaarderende liposomen. Alhoewel de resulterende nanodeeltjes gemakkelijk werden opgenomen in kankercellen zonder celdood te veroorzaken, zorgde de silica-coating helaas niet voor de beoogde zuurstofbescherming (noch in oplossing, noch in cellen), hoogstwaarschijnlijk door de porositeit van de silica-coating. Wanneer de silica-gecoate deeltjes werden gedroogd in een overmaat (organo)silica precursor werden echter interessante nano-composietmaterialen verkregen waarmee TTA-UC in lucht mogelijk was. Deze resultaten bevestigden dat (organo)silica onder bepaalde omstandigheden inderdaad TTA-UC materialen kan beschermen tegen zuurstof. Dit werk vertegenwoordigt een interessant voorbeeld van de combinatie van fosfolipiden, water, en silica voor het vervaardigen van lichtopwaarderende nanodeeltjes en materialen die eenvoudig kunnen worden afgestemd op de toepassing.

In een tweede benadering werd gerealiseerd dat het verwijderen van zuurstof uit de oplossing door middel van een fysieke methode (bubbelen van argon) kon worden vervangen door het toevoegen van een antioxidant die reageert met grondtoestand zuurstof, zoals natriumsulfiet (Figuur S.2b). Sulfiet zorgt voor een sterke afname van opgeloste zuurstof, waardoor stabiele en efficiënte TTA-UC in oplossing kan plaatsvinden. Veel antioxidanten die met grondtoestand zuurstof kunnen reageren zijn echter niet compatibel met biologische systemen (bijv. hydrazine) en ze putten langzaam uit wanneer zuurstof in de samples lekt. Om deze benadering te verbeteren werd een derde benadering nagestreefd met antioxidanten die alleen met aangeslagen singlet-toestand zuurstof kunnen reageren, zoals ascorbinezuur of glutathion (Hoofdstuk 8). Dit werkt als volgt: wanneer het TTA-UC systeem continu wordt bestraald, produceert de fotosensibilisator aangeslagen singlet-toestand zuurstof dat vervolgens reageert met de antioxidant totdat alle zuurstof in het monster is geconsumeerd. Deze strategie leidde tot zeer efficiënte en stabiele TTA-UC in lucht (> 80% stabiliteit gedurende het eerste uur bestraling). Zoals beschreven wordt in Hoofdstuk 9 kan de rol van antioxidant ook vervuld worden door histidine, trolox, of de antioxidanten die aanwezig zijn in celgroeimedium (bijv. bovien serum albumine of pyruvaat). Het gebruik van antioxidanten is dus een zeer algemene en krachtige strategie om de zuurstofgevoeligheid van vrijwel elk TTA-UC systeem te verminderen.

Activering van Ru prodrugs door middel van TTA-UC

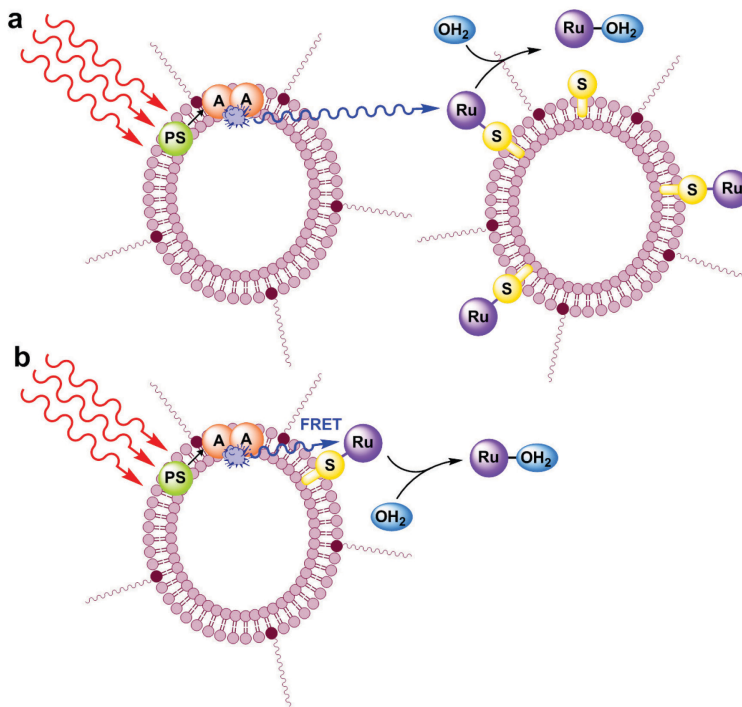
Het doel van dit proefschrift was de activering van Ru(II)-prodrugs met rood licht door middel van lichtopwaarderend in een geneesmiddelafgiftesysteem. Dit doel werd voor het eerst behaald in Hoofdstuk 3, waarin wordt beschreven hoe de fotochemische afsplitsing van een Ru(II)-polypyridylcomplex van liposomen werd getriggerd door lichtopwaarderende liposomen in een mengsel van rood-naar-blauw opwaarderende liposomen en Ru-complex gedoteerde liposomen (Figuur S.3a). In dit eerste werk werd het blauwe opgewaardeerde licht naar het Ru-complex overgebracht door middel van radiatieve energieoverdracht, d.w.z. door tussenkomst van een foton. Wanneer het Ru-complex in hetzelfde membraan werd gedoteerd als de lichtopwaarderende kleurstoffen, werd de energie door middel van Förster resonantie-energieoverdracht (FRET) overgebracht met meer dan 85% efficiëntie bij relatief lage Ru-complex hoeveelheden (4 mol% met betrekking tot de fosfolipiden), zoals beschreven in Hoofdstuk 4 en Figuur S.3b. Deze studies lieten zien dat Ru-prodrug activering door rood-naar-blauw TTA-UC veelbelovend is, maar werkte helaas nog niet in lucht vanwege het uitdoven van TTA-UC door zuurstof. Om het systeem in lucht te laten functioneren werd de fotoreactie succesvol uitgevoerd in aanwezigheid van ascorbinezuur en glutathion, zoals beschreven in Hoofdstuk 8. Er is ook geprobeerd om de liposomen met Ru-complex en TTA-UC-kleurstoffen te testen in cellen. De Ru complexen die werden gebruikt waren echter ook zeer giftig in het donker, en werden niet significant meer giftig onder bestraling van licht. Vanwege deze redenen kon de activatie door rood-naar-blauw TTA-UC in liposomen niet leiden tot een uitgesproken fotochemotherapeutisch effect, en de haalbaarheid van deze aanpak blijft dus nog onzeker. Op dit moment is meer onderzoek nodig naar het ontwerp van membraangebonden Ru-prodrugs met hoge giftigheid na bestraling en lage giftigheid in het donker om de activering-door-lichtopwaarderend benadering te valideren in biologische systemen.

Algemene opmerkingen

De resultaten beschreven in dit proefschrift verschaffen waardevolle inzichten voor het ontwikkelen van biologische TTA-UC toepassingen. Liposomen en polymeersomen werden succesvol gebruikt als multifunctionele rood-naar-blauw opwaarderend platform voor biofotografie en activering van lichtgevoelige Ru-prodrugs. Het is duidelijk gedemonstreerd dat blauw-licht gevoelige Ru-polypyridylcomplexen, die normaal gesproken niet gevoelig zijn voor licht in het fotherapeutische venster, kunnen worden geactiveerd door

Samenvatting in het Nederlands

rood licht door middel van TTA-UC. De biologische evaluatie van deze activering-door-lichtopwaardering strategie vereist meer wetenschappelijke aandacht om te achterhalen welke parameters optimalisatie nodig hebben, zoals het ontwerp van het nanodeeltje, stabiliteit van TTA-UC, zuurstofgevoeligheid en aanwezigheid van antioxidanten, lichtdosis, doteringshoeveelheid van kleurstoffen en prodrugs in het nanodeeltje, en de foto-index van de Ru-prodrugs. We verwachten dat de resultaten van dit proefschrift zullen leiden tot interessante toepassingen in fotogeactiveerde chemotherapie dat een alternatief biedt voor fotodynamische therapie in zuurstofarme tumoren.



Figuur S.3. Cartoon ter illustratie van de combinatie van TTA-UC in liposomen en lichtactiveerbare, membraangebonden Ru-polypyridylcomplexen. a) TTA-UC en Ru-complex zijn fysiek gescheiden op twee verschillende liposomen: het blauwe licht wat door TTA-UC wordt gegenereerd wordt aan het Ru-complex overgedragen door radiatieve energieoverdracht (Hoofdstuk 3), waarna het geactiveerde Ru-aqua complex vertrekt van het membraan. b) TTA-UC en Ru complex zijn gelokaliseerd op hetzelfde liposoom: het blauwe licht wat door TTA-UC wordt gegenereerd wordt via FRET aan het Ru complex overgedragen (Hoofdstuk 4). PS: fotosensibilisator; A: annihilator; FRET: Förster Resonance Energy Transfer.