



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## The synthesis and biological applications of photo-activated ruthenium anticancer drugs

Lameijer, L.N.

### Citation

Lameijer, L. N. (2017, December 14). *The synthesis and biological applications of photo-activated ruthenium anticancer drugs*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/58398>

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/1887/58398>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/58398> holds various files of this Leiden University dissertation.

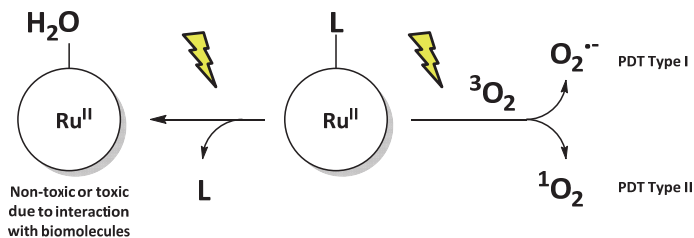
**Author:** Lameijer, L.N.

**Title:** The synthesis and biological applications of photo-activated ruthenium anticancer drugs

**Issue Date:** 2017-12-14

## Samenvatting

Conventionele chemotherapie is naast chirurgie en bestraling een van de voornaamste therapieën om kanker te bestrijden. Een groot nadeel is echter dat deze vorm van therapie vele bijwerkingen veroorzaakt in kankerpatiënten, omdat de drugs die worden gebruikt niet alleen de kankercellen, maar ook gezonde cellen aanvallen. Een mogelijke oplossing voor dit probleem is het lokaal activeren van zogenoemde ‘prodrugs’ met een externe stimulus, zoals licht. Zichtbaar licht (400 – 650 nm) kan tot een centimeter door de huid doordringen, waardoor er kan worden gereguleerd waar en wanneer de drugs worden geactiveerd. Dit biedt mogelijkheden om vormen van kanker te behandelen waar conventionele therapieën geen uitkomst bieden. In het veld van bioorganische chemie worden ruthenium(II) polypyridyl prodrugs (Ru-L) bestudeerd als mogelijke licht-actieveerbare verbindingen waarbij fotoactivatie leidt tot het verbreken van de Ru-L band. Hierbij komt óf een organisch ligand L en een gesolvateerd Ru-OH<sub>2</sub> adduct vrij (Fig 1, links), óf wordt er een fotodynamisch effect bewerkstelligd via het genereren van superoxide of singlet zuurstof (Fig 1, rechts). In theorie kan het geactiveerde deeltje, zoals bijvoorbeeld [Ru(tpy)(bpy)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> (bpy = 2,2'-bipyridine, tpy = 2,2':6',2''-terpyridine), reageren met in het menselijke lichaam aanwezige verbindingen als amines, thioethers of purines en pyrimidines, die aanwezig zijn in aminozuren, RNA, en DNA. Onder fysiologische condities kan de reactiviteit van deze biologische moleculen met [Ru(tpy)(bpy)H<sub>2</sub>O]<sup>2+</sup> leiden tot adducten zoals deze worden gevormd met cisplatina, hetgeen mogelijk leidt tot celdood. Echter, niet alle rutheniumverbindingen zijn toxisch en de rol van de liganden die achterblijven na fotosubstitutie speelt een kritische rol in de cytotoxiciteit van het gesolvateerde rutheniumadduct. Tegelijkertijd wordt ook een organisch ligand vrijgemaakt, hetgeen een drug kan zijn met een gedefinieerd doelwit en bekende modus operandi.



**Figuur 1.** Versimpeld diagram van het principe van foto-geactiveerde chemotherapie (PACT) gebaseerd op ruthenium(II) verbindingen. Twee verschillende mechanismen zijn afgebeeld: Links: Na bestraling met licht wordt een ligand of drug (L) losgelaten waarbij een gesolvateerd ruthenium deeltje wordt gevormd (Ru-OH<sub>2</sub>). Rechts: De ruthenium(II) prodrug gedraagt zich als een fotodynamisch agens via fotodynamisch therapie type I of type II.

Dit proefschrift beschrijft de synthese van nieuwe *foto-geactiveerde chemotherapie* (PACT) drugs gebaseerd op het  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{NN})\text{L}]^{n+}$  manifold en de mogelijke biologische toepassing hiervan als medicijn tegen kanker.

In hoofdstuk 2 is de synthese beschreven voor het onafhankelijk modificeren van elke positie (O1-O6) van D-glucose met een methylthioether groep. Deze verbindingen zijn vervolgens gebruikt als liganden voor niet-toxische, maar fotoactieve ruthenium complexen met de formules  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{bpy})(\text{L})]^{2+}$ ,  $[\text{Ru}(\text{S-tpy})(\text{bpy})(\text{L})]^+$  (S-tpy = [2,2':6',2''-terpyridine]-4'-sulfonzuur) en  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})]^{2+}$ . Het idee achter deze benadering was om te bepalen welke modificaties worden getolereerd door zogenoemde glucose-transporters (GLUTs). De belangrijkste uitdaging in dit werk was de synthese van respectievelijk de 2-O en de 4-O gemodificeerde suikers, omdat de geïntroduceerde functionele groep (methylthioether) het gebruik van benzyli(deen) beschermgroepen onmogelijk maakte.

Conventionele methoden om glucoseopname te bepalen via GLUTs maken gebruik van competitieve inhibitie met GLUT-inhibitoren zoals floretine. Bij deze benadering zijn de condities die worden gebruikt voor de analyse van cytotoxiciteit echter niet volledig nagebootst, wat de interpretatie van deze experimenten bemoeilijkt. In hoofdstuk 3 wordt een methode beschreven waarmee is onderzocht of een glucoseconjugaat actief wordt opgenomen door een glucose-transporter door de efficiëntie van de opname van twee chemisch equivalente glucose-enantiomeren (D/L) met elkaar te vergelijken. De synthese van de conjugaten wordt beschreven, waarbij de thioether gefunctionaliseerde glucoseliganden (D/L) zijn gecoördineerd aan het lipofiele  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppn})(\text{OH}_2)]^{2+}$  (dppn = benzo[*ij*]dipyrido-[3,2-*a*:2',3'-*c*]phenazine) complex. Tevens is de cytotoxiciteit, de opname in kankercellen en de lokalisatie van deze complexen in de cellen bepaald. Het gebruik van enantiomeren liet een eerlijke vergelijking van de cytotoxiciteit van beide conjugaten toe. Waarbij een vergelijking tussen het suikerconjugaat het 'normale' conjugaat niet zouden corrigeren voor het verschil in chemische structuur, polariteit en hydrofiliciteit. Submicromolaire waarden voor cytotoxiciteit zijn gevonden voor  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppn})(\text{L})]^{2+}$ , welke zijn toegeschreven aan de fotodissociatie van L, resulterend in de verbinding  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppn})(\text{OH}_2)]^{2+}$ . Dit geactiveerde deeltje heeft een bijzonder hoge affiniteit voor binding aan DNA, terwijl tegelijkertijd grote hoeveelheden reactieve zuurstofdeeltjes worden gegenereerd door bestraling met licht. Opmerkelijk genoeg is gevonden dat de D- en L-glucose-rutheniumconjugaten niet even cytotoxisch zijn in het donker, maar kan dit verschil niet worden toegeschreven aan opname via een glucose-transporter. Uit lokalisatiestudies bleek dat beide complexen aanwezig waren in de mitochondrieën. Onafhankelijk van het stadium van de groeifase, de toevoeging van een remmer van oxidatieve fosforylering (natrium azide) of de incubatietijd, werden beide verbindingen in dezelfde mate opgenomen. Dit duidt erop dat opname van deze complexen waarschijnlijk passief gebeurt, en kan het verschil in cytotoxiciteit worden toegeschreven aan een

---

enzymatisch proces na opname, zoals verschil in snelheid van uitscheiding of het enzymatische afbreken van de  $\beta$ -glycosidische band door een  $\beta$ -glucosidase. Hoewel de ruthenium-glucoseconjugaten die beschreven zijn in dit hoofdstuk niet worden opgenomen door glucose-transporters, maken de selectieve lokalisatie van de prodrugs, de hoge affiniteit die zij hebben voor mitochondriaal DNA en de efficiëntie voor de productie van singletzuurstof van deze complexen (0.71) hen bijzonder geschikte kandidaten voor fotodynamische therapie (PDT).

Op basis van de bevindingen beschreven in het hoofdstuk 3, wordt in hoofdstuk 4 gerapporteerd hoe zestien verschillende complexen gebaseerd op het  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{NN})(\text{L})]^{2+}$  manifold uitgebreid bestudeerd zijn op zowel hun biologische activiteit en opname in kankercellen als hun fotochemische eigenschappen. Hierbij is vooral gekeken naar het verschil tussen fotodynamische therapie en PACT. Door zowel de productie van singletzuurstof als de efficiëntie van fotosubstitutie te meten, is inzicht verkregen in de manier waarop deze metaalcomplexen werken. Structurele veranderingen van het bidentaats ligand NN in  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{NN})(\text{L})]^{2+}$  leiden tot verschillende fotochemische en biologische activiteit. Een van de belangrijkste bevindingen beschreven in hoofdstuk 4 is dat de structureel gelijkende analogons  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppz})(\text{L})]^{2+}$  (dppz = dipyrido[3,2- $\alpha$ :2',3'-c]phenazine) en  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppn})(\text{L})]^{2+}$  fotocytotoxiciteit veroorzaken door respectievelijk een PACT- en PDT-mechanisme. Ook bleek het complex  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppn})\text{Cl}]\text{Cl}$  sterk cytotoxisch tegen A549 and MCF-7 kankercellen na activatie met blauw licht. Dit is opmerkelijk, omdat de efficiëntie van singletzuurstofproductie voor deze verbinding erg laag is. Het is daarom aannemelijk dat deze verbinding hydrolyseert na opname waarbij  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppn})(\text{OH}_2)]^{2+}$  wordt verkregen, hetgeen een sterke PDT-verbinding is, zoals beschreven in hoofdstuk 3. Andere bevindingen beschreven in dit hoofdstuk zijn dat van de analogons  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{azpy})(\text{L})]^{2+}$  (azpy = 2-(phenylazo)pyridine) en  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{pymi})(\text{L})]^{2+}$  (pymi = ((*E*)-*N*-phenyl-1-(pyridin-2-yl)methanimine) alleen de laatste fotoreactief is en dat verhoogde intracellulaire opname in kankercellen niet per sé leidt tot verhoogde (foto)cytotoxiciteit. Een belangrijke bevinding is dat de verbinding  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppn})(\text{SRR}')](\text{PF}_6)_2$ , beschreven in hoofdstuk 3, een unieke prodrug is welke volgens zowel het PACT- als PDT-mechanisme werkt.

De meeste metaalcomplexen beschreven in hoofdstuk 4 bleken niet cytotoxisch na activering met licht. Nieuwe metaalcomplexen gebaseerd op het in dit proefschrift beschreven  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{NN})(\text{L})]^{2+}$  manifold zijn daarom ontworpen als alternatieve, monokationische PACT-verbindingen. De gecyclometallegeerde complexen die in de literatuur zijn beschreven absorberen vaker bij een langere golflengte dan niet-gecyclometallegeerde verbindingen. Tevens zijn ze vaak meer cytotoxisch voor kankercellen. Omdat de symmetrie in het  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{NN})(\text{L})]^{2+}$  manifold vervalt wanneer een van de buitenste stikstofatomen in het tridentaats ligand wordt vervangen door een

koolstofatoom, ontstaat een chirale verbinding. In hoofdstuk 5 is beschreven hoe twee diastereoisomeren gebaseerd op  $[\text{Ru}(\text{phbpy})(\text{phen})(\text{SORR}')^+]$  (Hphbpy = 6'-phenyl-2,2'-bipyridyl, SORR' = (*R*)-methyl *p*-tolylsulfoxide) zijn gesynthetiseerd en van elkaar zijn gescheiden op een chirale kolom. Tevens is er een uitgebreide studie gedaan naar de fotofysische eigenschappen van racemische mengsels van complexen gebaseerd op  $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{NN})(\text{dmsO-kS})]^+$  met een toenemende grootte van het aromatisch systeem van de bidentaat liganden (NN = bpy, dpq, phen, dppz and dppn, dpq = pyrazino[2,3-*f*][1,10]phenanthroline, phen = 1,10-phenanthroline). In vergelijking tot de tpy analogons beschreven in hoofdstuk 4, hebben deze gecyclometalleerde complexen een veel lager fotosubstituerendement. Voor de complexen met het bidentaat ligand dppz of dppn is de mogelijkheid tot fotodissociatie zelfs volledig afwezig. Dichtheidsfunctionaaltheorieberekeningen en cyclische voltammetrie hebben verder laten zien dat de verminderde fotoreactiviteit van deze complexen het resultaat is van een groter verschil in energie tussen de  $^3\text{MLCT}$  (triplet metaal-naar-ligand ladingsoverdrachttoestand) - en  $^3\text{MC}$ -toestand (triplet metaalgecentreerde toestand), waardoor thermische populatie van de  $^3\text{MC}$ -toestand vanuit de gegenereerde  $^3\text{MLCT}$  aangeslagen toestand minder waarschijnlijk is. De bredere absorptieband van deze complexen stond toe dat drie van hen kunnen worden geactiveerd met groen licht (520 nm) in A549 and MCF-7 cellen, waarbij submicromolaire fotocytotoxiciteit kon worden bewerkstelligd. Dit moet waarschijnlijk worden toegeschreven aan een PDT type-I mechanisme, maar de lokalisatie, het doelwit en de modus operandi van deze verbindingen zal verder moeten worden onderzocht.

Een nadeel van de huidige lichtactiveerbare ruthenium(II)-polypyridyl prodrugs is dat deze meestal worden geactiveerd met golflengtes die ver buiten het fotherapeutische gebied vallen (600 – 850 nm). In hoofdstuk 3 – 5 is beschreven dat niet sterisch-gehinderde complexen gebaseerd op  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{NN})(\text{L})]^{2+}$  of  $[\text{Ru}(\text{phbpy})(\text{NN})(\text{L})]^+$  kunnen worden geactiveerd met blauw of groen licht. Deze golflengten hebben echter een beperkte penetratiediepte in weefsel. Hoewel er systemen worden ontwikkeld om rood licht om te zetten naar blauw licht, is de efficiëntie van fotoactivering vaak laag waardoor toepassing in biologische systeem problematisch blijft. In het verleden heeft de groep van Bonnet sterisch-gehinderde rutheniumverbindingen gesynthetiseerd gebaseerd op  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{NN})(\text{L})]^{2+}$ , met 6,6'-dimethyl-2,2'-dipyridyl (dmbpy) of 2,2'-biquinoline (biq) als bidentaat ligand. Hoewel een hoog kwantumrendement voor fotodissociatie kon worden verkregen wanneer een thioether als monodentaat ligand (L) werd gebruikt, bleken deze verbindingen erg instabiel en dus niet geschikt te zijn om te worden gebruikt als fotoactieve prodrugs. Sterische, niet gehinderde pyridine liganden (L) daarentegen, hebben een lager kwantumrendement voor fotodissociatie, maar zijn veel stabiel in het donker. In hoofdstuk 6 worden de twee complexen  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dmbpy})(\text{STF-31})]^{2+}$  en  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{biq})(\text{STF-31})]^{2+}$  beschreven, welke de bekende NAMPT-remmer (NAMPT =

---

nicotinamide phosphoribosyltransferase) STF-31 als monodentaat ligand bevatten. De binding van de pyridinegroep van STF-31 aan het ruthenium(II)-centrum resulteerde in nieuwe <sup>1</sup>MLCT absorptiebanden, waardoor activatie met dieper doordringend rood licht mogelijk werd. Ondanks de relatieve lage molaire absorptiecoëfficiënt voor rood licht, kunnen deze verbindingen binnen tien minuten volledig geactiveerd worden door de hoge efficiëntie voor fotosubstitutie bij lichaamstemperatuur (37 °C). Er is gekeken naar het effect van [Ru(tpy)(biq)(STF-31)]<sup>2+</sup> op cellen bij zowel normale (21%) als lage zuurstofconcentraties (1%); de resultaten laten zien dat het vrijmaken van de verbinding STF-31 leidt tot een fotocytotoxisch effect onder zowel hypoxische als normoxische condities. Het feit dat dit gebeurt zonder verlies van fotocytotoxiciteitindex, (de ratio tussen de celdood in het donker en in het licht) – hetgeen wel zou gebeuren bij zuurstofafhankelijke fotodynamische therapie - is de eerste demonstratie van de potentie van PACT ten opzichte van PDT, aangezien kankercellen vaak zuurstofarm zijn.