



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Caging ruthenium complexes with non-toxic ligands for photoactivated chemotherapy

Cuello Garibo, J.A.

Citation

Cuello Garibo, J. A. (2017, December 19). *Caging ruthenium complexes with non-toxic ligands for photoactivated chemotherapy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/58688>

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/1887/58688>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/58688> holds various files of this Leiden University dissertation.

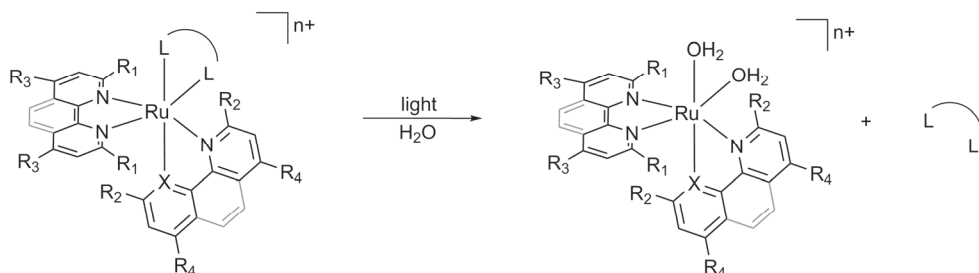
Author: Cuello Garibo J.A

Title: Caging ruthenium complexes with non-toxic ligands for photoactivated chemotherapy

Issue Date: 2017-12-19

SAMENVATTING

Het hoofddoel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was de ontwikkeling van nieuwe fotoactiveerbare chemotherapie (PACT), gebaseerd op van ruthenium(II)-complexen die een atoxisch, fotolabel ligand bevatten. De geschiktheid van het lichaamseigen aminozuur L-proline als beschermend ligand is beschreven in Hoofdstuk 2 in een serie complexen van het type $[\text{Ru}(\text{N},\text{N})_2(\text{L-prolinaat})]\text{PF}_6$. Het aantal sterisch gehinderde methylgroepen in deze serie is geleidelijk verhoogd van nul in $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L-prolinaat})]\text{PF}_6$ (**[1]** PF_6 , bpy = 2,2'-bipyridine) tot twee in $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dmbpy})(\text{L-prolinaat})]\text{PF}_6$ (**[2]** PF_6 , dmbpy = 6,6'-dimethyl-2,2'-bipyridine) tot vier in $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2(\text{L-prolinaat})]\text{PF}_6$ (**[3]** PF_6). Er is geconstateerd dat de fotoreactiviteit van dit type complexen afhankelijk is van het oplosmiddel: terwijl in waterige oplossing geen van de bovengenoemde complexen substitutie vertonen onder bestraling met licht, fotosubstitueren de sterisch gehinderde complexen **[2]** PF_6 en **[3]** PF_6 in acetonitril op het ligand L-proline of dmbpy, óf beiden in parallel. Interessant is verder dat **[1]** PF_6 in aanwezigheid van zuurstof twee waterstofatomen verliest na lichtbestraling in water, en daarmee tot het iminocomplex $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L-prolinaat} - 2\text{H})]\text{PF}_6$ foto-oxideert. De aanwezigheid van elektrondonerende methylgroepen in **[2]** PF_6 en **[3]** PF_6 verlaagt de zuurgraad van het amine, en voorkomt zo de oxidatie tot imine. Gezien de stabiliteit van het ruthenium-prolinaatcomplex in water en de niet-selectieve fotosubstitutie in acetonitril werd het gebruik van het negatief geladen L-prolinaat als beschermiligand verworpen en in het verlengde daarvan ook alle andere natuurlijke aminozuren met een *N,O*-coördinatie.



Schema 1. Fotosubstitutie van een bidentaalligand in een ruthenium(II)-polypyridylcomplex veroorzaakt door lichtbestraling in water. In het onderzoek bescreven in dit proefschrift zijn de octaëdrische verstoring en lipofiliteit van de complexen gevarieerd door de functionele groepen R_1 , R_2 , R_3 , en R_4 aan te passen. $X = \text{N}$ of C .

Samenvatting

Glazer *et al.* heeft de fotocytotoxiciteit van $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dmbpy})]\text{Cl}_2$ op longkanker cellen (A549-cellen) gerapporteerd, en heeft deze toxiciteit, analoog aan de werking van cisplatina, toegeschreven aan het fotogegeneerde complex $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$.¹ In hoofdstuk 3 laten we echter zien dat het ligand dmbpy, dat ook vrijkomt bij de fotoreactie, op zichzelf ook giftig is. Daarom rees de vraag: is $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ cytotoxisch? Kan een PDT-effect worden uitgesloten? Om de rol van $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ te onderzoeken hebben we de fototoxiciteit van $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dmbpy})]\text{Cl}_2$ vergeleken met die van $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{mtmp})]\text{Cl}_2$ (mtmp = 2-(methylthio)methylpyridine), met een neutraal, zwavel-bevattend bidentaats ligand. De complexen zijn vergelijkbaar in hun reactiviteit: ze produceren $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ onder bestraling met licht, ze hebben een lage quantumopbrengst voor de productie van singletzuurstof, en ze hebben een vergelijkbare lipofiliteit en een lage celopname. Het verschil tussen de twee complexen is dat het vrijkomende ligand mtmp zelf niet cytotoxisch is. Als A549-cellen met $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{mtmp})]\text{Cl}_2$ behandeld worden, wordt er geen cytotoxisch effect waargenomen worden, noch in het donker noch na bestraling met licht. Derhalve hebben we geconcludeerd, dat het fotogegeneerde $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ niet cytotoxisch is, en dat de cytotoxiciteit, die na bestraling van $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dmbpy})]\text{Cl}_2$ met licht wordt waargenomen, veroorzaakt wordt door het vrijgekomen dmbpy. Echter, het lipofielere complex $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{mtmp})]\text{Cl}_2$ (Ph_2phen = 4,7-difenyl-1,10-fenantroline) laat na bestraling met licht verhoogde cytotoxiciteit zien. Op basis van de bevindingen kan worden geconcludeerd dat, een rutheniumcomplex zelf cytotoxisch kan zijn, maar het complex moet dan wel lipofiel genoeg zijn om te worden opgenomen door kankercellen.

De geschiktheid van *N,S*-moleculen als beschermende liganden, en het belang van een bepaalde mate van lipofiliteit die nodig is om cytotoxische activiteit te bereiken, heeft tot de synthese van een nieuwe serie van complexen geleid die het *N,S*-ligand 3-(methylthio)propylamine (mtpa) bevatten, hetgeen in Hoofdstuk 4 beschreven staat. In deze serie wordt de octaëdrische verstoring en lipofiliteit van het complex verhoogd door het toevoegen van methylgroepen op 6- en 6'-positie van het bpy-ligand, zoals in Hoofdstuk 2 voor L-prolinaatcomplexen beschreven is. Het aantal methylgroepen in de verbindingen heeft een cruciaal effect op de fotochemie en cytotoxische activiteit van deze complexen. Terwijl het sterisch ongehinderde complex $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{mtpa})](\text{PF}_6)_2$ mtpa niet volledig fotosubstitueert en dus niet fototoxisch voor A549-cellen is, laat het meer sterisch gehinderde complex $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{dmbpy})(\text{mtpa})](\text{PF}_6)_2$ efficiënte mtpa-fotosubstitutie zien onder bestraling met blauw licht, hetgeen dan ook tot fotocytotoxiciteit leidt. Wanneer het complex echter te sterisch gehinderd is, zoals in

[Ru(dmbpy)₂(mtpa)](PF₆)₂, wordt het ook thermisch in het donker geactiveerd en verliest daardoor zijn selectieve fotoactiviteit. De karakterisatie van deze complexen was niet triviaal. Naast de chiraliteit van de octaëder (Δ of Λ) zijn er nog twee bronnen van isomerie aanwezig in deze complexen: de configuratie (*S* of *R*) van het gecoördineerde zwavelatoom, en de stoelinversie van de zesring die resulteert uit de coördinatie van het *N,S*-chelende ligand aan het rutheniumion. De laatste vorm van isomerie transformeert een axiale thioethermethylgroep (*ax*) in een equatoriale groep (*eq*) en *vice versa*. Dit leidt tot een totaal van vier isomeren voor [Ru(bpy)₂(mtpa)](PF₆)₂ en [Ru(dmbpy)₂(mtpa)](PF₆)₂, en acht isomeren voor [Ru(bpy)(dmbpy)(mtpa)](PF₆)₂, in het laatste geval mede veroorzaakt doordat het zwavelatoom van mtpa zowel *trans* ten opzichte van de bpy als de dmbpy kan staan. Ondanks de complexiteit van de stereochemische identificatie van deze complexen, zijn ze allemaal volledig gekarakteriseerd door een combinatie van 2D-NMR spectroscopie en DFT-berekeningen. De interligand-interactie tussen de waterstofatomen in de axiale positie van de mtpa-stoelconformatie en de substituenten op positie 6 van het bpy-ligand bleken de drijvende kracht in de stereoselectiviteit van de synthese te zijn.

Aangezien *N,S*-liganden beter blijken te zijn dan *N,O*-liganden voor toepassing in PACT rutheniumcomplexen, door hun selectieve fotosubstitutie, zijn deze liganden ook geselecteerd voor de synthese van fotoactiveerbare gecyclometaleerde rutheniumcomplexen van het type [Ru(bpy)(phpy)(*N,S*)]PF₆ (phpy = 2-fenylpyridine) (Hoofdstuk 5). Het effect van de grootte van de chelaat ring van het *N,S*-ligand op het rutheniumion (vijfring *vs.* zesring) en de aard van het stikstofdonoratoom (primaire amine *vs.* pyridine) is systematisch onderzocht. Coördinatie van 2-(2-methylthioethyl)pyridine (mtep) of mtpa aan het ruthenium(II)ion resulteert in een zesring met stoelconformatie en leidt tot één van acht mogelijke isomeren. Maar als het *N,S*-ligand tot een chelende vijfring leidt (bij 2-methylthioethylamine (mtea) of mtmp), werden twee of drie isomeren verkregen, die moeilijk van elkaar te isoleren scheiden waren. De grootte van de chelaatring van het *N,S*-chelende ligand kan dus gebruikt worden om de stereoselectiviteit van de reactie te sturen. Bovendien leiden complexen met *N,S*-liganden die in een zesring coördineren tot een snellere fotosubstitutie in acetonitril, dan hun analogen met een vijfring chelaat. Waarschijnlijk is re-chelatie in het laatste geval sneller, waardoor de gehele fotosubstitutiesnelheid verlaagd wordt. Tenslotte, als het stikstofdonoratoom van het *N,S*-ligand een pyridine is, bleek het complex minder gevoelig voor oxidatie te zijn dan wanneer het een primaire amine betreft. We schrijven dit effect toe aan de *trans*-positie van het π -

Samenvatting

accepterende pyridineligand ten opzichte van het koolstofdonoratoom, waarmee de hoge elektronendichtheid in het rutheniumion, veroorzaakt door de cyclometallering, gestabiliseerd wordt. Het complex $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{phpy})(\text{mtep})]\text{PF}_6$, dat een op pyridine gebaseerd *N,S*-ligand bevat dat een zesring chelaat vormt, vervult alle criteria om een veelbelovend PACT medicijn te worden: het kan op een stereoselectieve manier gesynthetiseerd worden, is stabiel onder zuurstofrijke condities in het donker en het niet-toxische *N,S*-ligand wordt effectief gefotosubstitueerd onder bestraling met groen licht.

In het laatste hoofdstuk vroegen we ons af of de rutheniumcomplexen die in dit proefschrift beschreven staan, échte PACT medicijnen zijn. In andere woorden: kan het lage quantumrendement voor de productie van singletzuurstof (Φ_d) de waargenomen cytotoxiciteit verklaren? Ten eerste hebben we, als controle voor de hypoxische belichtingsopstelling, laten zien dat de fotocytotoxiciteit van de fotosensibilisators Rose Bengal en $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{bpy})]\text{Cl}_2$ sterk gereduceerd wordt bij 1% O_2 . De lage zuurstofconcentratie reduceert de fotoindex (PI), d.w.z. de verhouding tussen de EC_{50} waarden verkregen bij behandeling in het donker met die verkregen na lichtbestraling, naar respectievelijk 3.0 en 1.9, vergeleken met de veel hogere gemeten waarden bij normoxia (respectievelijk >400 en 29). Dezelfde opstelling werd gebruikt om de cytotoxiciteit van de vermeende PACT-complexen $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{Ph}_2\text{phen})(\text{mtmp})](\text{PF}_6)_2$ en $[\text{Ru}(\text{dmbpy})_2(\text{mtmp})]\text{Cl}_2$ te testen, welke een duidelijke toxiciteitverhoging na bestraling met groen licht in hypoxische condities lieten zien. De cytotoxiciteit in het donker was te laag om een PI te bepalen, die voor een écht PACT medicijn voor normoxische en hypoxische condities in hetzelfde gebied zou moeten liggen.² Samenvattend kan gezegd worden dat het gebruik van hypoxische condities erg interessant is om te testen of een fotosubstituerend complex ook daadwerkelijk een echte, zuurstofafhankelijke PACT-verbinding is, of een zwak, doch gericht PDT medicijn.

References

1. B. S. Howerton, D. K. Heidary and E. C. Glazer, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 8324-8327.
2. L. N. Lameijer, D. Ernst, S. L. Hopkins, M. S. Meijer, S. H. C. Askes, S. E. Le Dévédec and S. Bonnet, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2017**, 56, 11549-11553.