



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Synergy of intercalation and coordination binding to design novel DNA-targeting antineoplastic metallodrugs

Roy, Sudeshna

Citation

Roy, S. (2008, November 25). *Synergy of intercalation and coordination binding to design novel DNA-targeting antineoplastic metallodrugs*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13281>

Version: Corrected Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/13281>

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

Samenvatting

Inleiding

Kanker is tot op heden wereldwijd een belangrijke dodelijke bedreiging. Deze ziekte is niet één enkele kwaal, maar eerder een verzameling van honderden verschillende ziekten. Voor mensen werd kanker beangstigend door verschillende redenen, bijvoorbeeld (a) late diagnose, (b) niet beschikbaar zijn van “shure-shot”-geneesmiddelen, (c) kosten van lange behandelingen en (d) geestelijke en fysieke conditie van de patiënt. Naast chirurgie en stralingstherapie chemotherapie is een nuttig hulpmiddel voor de behandeling van kanker. De meerderheid van de beschikbare chemotherapeutische medicijnen zijn organische medicijnen of natuurlijke producten. De geneeskrachtige successen van medicijnen als cisplatina, carboplatina, oxaliplatina, satraplatina hebben geleid tot inzicht in mogelijkheden van het gebruik van andere overgangsmetalen en -complexen in de behandeling van kanker. De fascinerende chemie van metalen en liganden is al minstens drie decennia een belangrijk onderdeel van bioanorganisch chemieonderzoek geweest. Het is gebleken dat door in het ontwerp van medicijnen gebruik te maken van de metalen ruthenium, goud, titanium en gallium de grootste kans bestaat dat deze medicijnen efficiënt zijn.

Verscheidene kwesties spelen een rol in het ontwerp en de ontwikkeling van een metallomedicijn van het laboratorium tot het uiteindelijk gebruik. De fysico-chemische (b.v. de oplosbaarheid en stabiliteit tijdens toediening en opslag) en biofarmaceutische (b.v. biologische beschikbaarheid, distributie in fysiologisch milieu, accumulatie/uitscheiding) problemen hebben prioriteit om te worden opgelost. De giftigheid en weerstandsfactoren zijn ook van significant belang, omdat de conventionele metallomedicijnen leiden tot ernstige systemische giftigheid (niet-selectieve remming van de cellulaire groei) en weerstand (intrinsiek of verworven) na korte blootstelling. Bovendien vormt het beperkte venster van activiteit van metallomedicijnen een uitdaging door het gevarieerde groeipercantage, de cellulaire verwerking en de weerstandsmechanismen van kankercellen. Daarom kan het onderzoek tegen kanker, ruim gezien, door twee verschillende benaderingen worden gestuurd, namelijk, (1) ‘Trial and Error’-methode en (2) ‘Slimme medicijn’, dat rationeel wordt ontworpen met behulp van beschikbare gegevens en feiten. Deze twee benaderingen kunnen of succesvol zijn of tevergeefs, omdat het gedetailleerde mechanisme van de groei van kankercellen nog niet geheel bekend is. In dit proefschrift is de tweede benadering gekozen in de overweging van het ontwerp van de ruthenium en platina metaalcomplexen, die op tweevoudige wijze een wisselwerking kunnen hebben met

het belangrijkste cellulaire doel, genomisch DNA. Intercalatoren en coördinatiebinders zijn gebruikt om nieuwe complexen te synthetiseren en hun interactie met biomoleculen te onderzoeken.

Algemene bespreking en samenvatting

Het proefschrift bestaat uit acht hoofdstukken met inbegrip van een algemene inleiding over anorganisch geneeskundig onderzoek. Hoofdstuk 1 begint met de algemene inleiding over kanker en enkele belangrijke feiten en cijfers over deze ziekte. Er is veel gepubliceerd over bijna alle overgangsmetalen die voor mogelijke toepassingen tegen kanker zijn getest. Sommige representatieve metalen en hun coördinatiecomplexen zijn gekozen vanwege hun veelbelovende activiteitenprofiel en subtiele feiten die ze de verdere ontwikkeling zouden kunnen remmen, of helpen om het toepasbaar te maken. De belangrijkste metalen zijn ruthenium en platina, en deze twee metalen zijn gebruikt in dit proefschrift om nieuwe complexen te synthetiseren. De mogelijke liganden en de algemene structuur van de complexen zijn geïnspireerd op eerder gevonden klinisch relevante complexen. Het laatste deel van dit hoofdstuk is gericht op de intercalatie en het knippen van DNA door metaalcomplexen, met hun toepassing in de behandeling van kanker.

Fenanthrolines en verscheidene derivaten ervan zijn jarenlang in geneeskundig gebruik geweest. Vier specifieke derivaten en twee platinacomplexen zijn gesynthetiseerd en beschreven in Hoofdstuk 2. Sommige platinacomplexen met het diiminekader zijn bekend in de literatuur vanwege hun fotofysische eigenschappen. De cytotoxiciteitsanalyses tonen een hoge activiteit van fendione (1,10-fenanthroline-5,6-dione), dppz (dipyrido[3,2-a:2',3'-c]fenazine) en dpq (dipyrido[3,2-f:2',3'-h]quinoxaline) met een selectieve activiteit van dop (5,6-dioxime-1,10-fenanthroline) tegen zeven kankercelvariëteiten. De toevoeging van metalen heeft echter een vergelijkend schadelijk effect. De interactiestudies met DNA tonen een gecombineerd effect van intercalatie en coördinatieve binding aan DNA. De veranderingen in de stabiele vorm van DNA zijn significant en kunnen worden beschreven als resultaat van metaal- of ligand-interactie. De antimicrobiale activiteit van fendione kan worden gewijzigd door enkel de aromaticiteit uit te breiden. Dit hoofdstuk resulteert in effectieve liganden en een zeer actief platina-fendione-complex.

De invloed van het ligandkader en de waterstofbindende eigenschappen zijn bestudeerd in Hoofdstukken 3 en 4. Twee heterocyclische secundaire aromatische aminen, dpa (bis(pyridine-2-yl)amine) en dipm (bis(pyrimidine-2-yl)amine), zijn geselecteerd. Vier

platinacomplexen, die deze twee liganden bevatten, zijn gesynthetiseerd en de zogenaamde open-boekstructuren zijn geoptimaliseerd. De andere gekozen liganden zijn chloriden of ammines om respectievelijk de 'activering na hydrolyse' en niet-hydrolyseerbare groepen te vergelijken. De intercalative interactie is meer prominent met ammine-platina-complexen, die door elektrostatische aantrekking naar de strengen van DNA worden geleid. De chlorido-platina-complexen worden positief geladen na hydrolyse (zoals in het geval van cisplatina-activering) en coördineren aan guanineplaatsen of intercaleren gedeeltelijk. De gebogen structuren remmen de volledige invoeging in de basisparen af. De slechte oplosbaarheid van platina-chloride complexen is gewijzigd door ze in platina-ammine-complexen te veranderen. De gematigde tot lage activiteit tegen kankercelvariëteiten kan worden verklaard door de snelle verwijdering van platinacomplexen door verscheidene platinofielen. Dit is bewezen door de hoge affiniteit van runder-serum albumine voor platina-chloride-complexen. De amminecomplexen laten selectief een zeer hoge giftigheid tegen de cellenvariëteit EVSA-T zien. De lipofiliciteitsanalyse wijzen erop dat de amminecomplexen hydrofiel zijn, terwijl de chloridocomplexen betrekkelijk lipofiel zijn. De model-basisstudies tonen de geleidelijke vorming van een monoadduct met 9-ethylguanine, maar er kan geen bis-adduct worden geïdentificeerd. De elektroforesestudies bewijzen een sterke binding met DNA in plaats van een knip. Het mechanisme van selectieve activiteit moet nog worden opgelost.

Het redoxactieve ligand Hpyramol (4-methyl-2-N-(2-pyridylmethyl)aminofenol) is gebruikt om de platina- en kopercomplexen te bereiden uit Hoofdstuk 5 en een rutheniumcomplex uit Hoofdstuk 6. Dit ligand reageert tot Hpyrimol (4-methyl-2-N-(2-pyridylmethylene)aminofenol) tijdens de coördinatiereactie. Het ligand ondergaat een door metaal bemiddelde oxidatieve dehydrogenering in het geval van platina en koper. Het ruthenium-centrum oxideert het ligand en wordt zelf gereduceerd tot Ru(II). De motieven voor binding zijn eveneens verschillend. Het complex met koper is zeer actief in de cellenvariëteiten L1210(0) en L1210(2) en overwint cisplatinresistentie. Het complex met platina is niet actief ondanks het feit dat het platina is opgenomen en dat het in cellen van het type A2780 en A2780R accumuleert. Beide complexen knippen DNA zonder specificiteit door een single-strand knip, maar het complex met koper knipt katalytisch en het complex met platina knipt slechts stoichiometrisch. Het knippen dat door het complex met platina wordt veroorzaakt, is in een hogere mate onomkeerbaar in vergelijking met het complex met koper. Beide complexen denatureren de DNA-base-stacking, vergezeld door afwikkeling. Het ruthenium complex daarentegen vertoont bijna geen knip in het DNA. Dit

complex laat niettemin vergelijkbare cytotoxiciteit zien met cisplatina. Dit complex is het eerste voorbeeld van een complex met twee trans-chloride liganden dat een prominente activiteit toont. De structuren van al deze complexen zijn gekarakteriseerd met behulp van röntgendiffractie.

Een studie met terpyridine-liganden is beschreven in Hoofdstuk 7. Twee Ru(III)-complexen met terpy en zijn 4-chloorderivaat zijn gebruikt om de complexen te bereiden. Het ligand Hpyrimol is ook toegevoegd aan de Ru(terpy)-kern om een monofunctioneel complex samen te stellen. Het ligand bisterpyridine is gebruikt om dinucleaire Ru(II)-complexen samen te stellen met twee verschillende aanvullende liganden, namelijk fenanthroline en dppz. Alle complexen, als ook de vrije liganden, zijn gebruikt om de interactie met DNA te onderzoeken. Allemaal vervormen ze in zekere mate de rechtshandige schroef van B-DNA, maar deze interactie kan niet worden gecorreleerd met de lagere activiteit van Ru(III)-complexen. De algemeen geaccepteerde 'activering door reductie' is niet toe te passen op deze complexen. Daarnaast vertoont het dinucleaire ruthenium complex met dppz een hoge activiteit in vergelijking met dinucleaire bpy- of terpy-complexen.

Het effect van verschillende metaalcentra op de biologische activiteit is bestudeerd in Hoofdstuk 8. Het flexibele ligand dtdeg (bis[4'-(2,2':6',2''-terpyridyl)]-diethyleneglycol ether) is gebruikt om dinucleaire Ru(III)-, Pt(II)- en Cu(II)-complexen te synthetiseren, die een verschillend aantal hydrolyseerbare chloriden bevatten. Het platina complex laat een hogere activiteit zien dan cisplatina en is in sommige cellenvariëteiten vergelijkbaar met doxorubicine. Het CD-sigitaal veroorzaakt door het ruthenium complex is een aanwijzing voor een sterke interactie met DNA. De algemene veranderingen, die door metaalcomplexen worden veroorzaakt, zijn gelijkwaardig en daarom wordt verwacht dat de complexen actief zijn tegen kankercellen. In aanwezigheid van hoge concentraties van complexen is de verstoring in de stabiliteit van DNA zeer significant.

Toekomstige ontwikkelingen

De onderzoeks- en synthesesmogelijkheden in coördinatiechemie lijken eindeloos te zijn. Verscheidene richtingen om verder onderzoek uit te voeren kunnen worden overwogen. Sommige veelbelovende metaalcomplexen vloeiden uit dit werk voort, maar de cellulaire verwerking is niet bekeken. Deze verwerking kan gemakkelijk worden bekeken door het complex met een fluoriserend ligand (anthraceen) te merken of door een fluoriserende staart vast te maken aan de gebruikte liganden. In het geval van de Pt-

pyrimol- en Cu-pyrimol-complexen kan de accumulatie van metalen worden bewezen zonder verklaring van de inactiviteit tegen de meeste cellenvariëteiten. Voor de dinucleaire ruthenium- en kopercomplexen zijn geen markeringen gepubliceerd. Het is daarom een belangrijke uitdaging om het lot van het metaalcomplex te bepalen.

In sommige gevallen beperkt de oplosbaarheid van de metaalcomplexen de biologische studies (b.v. $[\text{Pt}(\text{dppz})\text{Cl}_2]$ en $[\text{Cl}_3\text{Ru}(\text{dtdeg})\text{RuCl}_3]$) en zal het interessant zijn om een in water oplosbare tegenhanger van deze complexen te synthetiseren. Deze synthese kan worden gedaan door de coördinatie van een carboxylzuurgroep (malonaat of cyclobutanedicarboxylaate) aan het metaal centrum of door een sulfonaatgroep aan liganden te binden. De in water oplosbare complexen $[\text{Pt}(\text{dpa})(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ en $[\text{Pt}(\text{dipm})(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ vertonen bijna geen activiteit in de meeste cellenvariëteiten. Daarom is het lonend om het mechanisme van cellulaire distributie en uiteindelijk snelle verwijdering uit het cytosol te onderzoeken. De dinucleaire homometallische complexen zijn interessant vanwege hun sterke interactie met DNA en daarom lijken de synthese en de biologische studies naar heterometallische complexen met chloriden als dragerliganden interessant te zijn.

Een andere manier voor diversificatie is gebruik te maken van onlangs ontwikkelde nanotechnologie om de metaalcomplexen selectief naar kankercellen te brengen en daardoor gezonde cellen te ontlasten. Dit kan ideaal worden uitgevoerd door een nanocarrier te ontwerpen die tegelijkertijd een richtend middel en een medicijn kan vervoeren. Deze ‘state of the art’-technologie kan het gemakkelijker maken om een dodelijk chemotherapeutisch medicijn met een hogere concentratie naar kankercellen te brengen met een eenvoudige blootstelling. Een ander voordeel zou verminderde systemische giftigheid met verbeterde klinische doeltreffendheid zijn.

De derde aanpassing van metallodrugs, met behoud van van de chemische formule, is het omzetten in een nanocapsule. Door inkapseling met behulp van een lipidelaag kan het medicijn voor een groter deel aan de kankercellen worden geleverd. Het is reeds bewezen dat deze interessante benadering werkt door de Kroon *et al.* Nanocapsules gevormd door cisplatina en carboplatina vertoonden een verbeterde activiteit. De in water oplosbare platina- of rutheniumcomplexen kunnen gemakkelijk worden ingekapseld en naar kankercellen worden vervoerd. Door gebruik te maken van nanocapsules is de doeltreffendheid gestegen van 10 keer (A2780) naar 1000 (IGROV) vergeleken met het vrije medicijn. Daarom kan deze wijziging het activiteitenprofiel van inactieve complexen verbeteren naar matig of bijzonder actieve medicijnen.

