



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The metallophilic interaction between cyclometalated complexes: photobiological applications

Zhou, X.

Citation

Zhou, X. (2021, May 26). *The metallophilic interaction between cyclometalated complexes: photobiological applications*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3158746>

Version: 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/1887/3158746>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle #<https://hdl.handle.net/1887/3158746> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Zhou, X.

Title: The metallophilic interaction between cyclometalated complexes: photobiological applications

Issue Date: 2021-04-08

SAMENVATTING VAN DIT PROEFSCHRIFT

Wereldwijd is kanker een belangrijke doodsoorzaak. Chemotherapie gebaseerd op kleine moleculen wordt beschouwd als een van de belangrijkste behandelingen om kanker te bestrijden, alhoewel chemotherapeutische behandelingen vaak gepaard gaan met ernstige bijwerkingen. Nanogeneeskunde en fotodynamische therapie (PDT) vertegenwoordigen in dit opzicht opkomende alternatieven, die gericht zijn op het verminderen van de bijwerkingen van de behandeling. Door een rationeel ontwerp kunnen nanodragers de eigenschap hebben om de accumulatie van geneesmiddelen op de locatie van de tumor te verhogen via een verbeterde permeabiliteit- en retentie-effect (EPR), die de systemische cytotoxiciteit van nanogeformuleerde geneesmiddelen verlaagt. PDT is een vorm van door licht geactiveerde antikankerbehandeling met een fotosensibilisator (meestal kleine moleculen), fotonen en moleculair zuurstof. Deze methode kan selectief de medicijnen in de tumor activeren en zo celdood induceren, terwijl er geen schade wordt aangericht aan de omliggende gezonde, niet bestraalde cellen. Fotosensibilisatoren die bestaan uit kleine moleculen vertonen echter nog steeds enkele van de nadelen van chemotherapie, zoals een lage ophoping in de tumor en snelle verwijdering uit het bloed. Padeliporfin (Tookad®, een klinisch goedgekeurde fotosensibilisator op palladiumbasis) bereikt bijvoorbeeld zijn hoogste plasmaconcentratie in het menselijk lichaam in slechts 5 minuten en wordt vervolgens snel door de nieren afgebroken en afgevoerd. In dit proefschrift zijn PDT en nanogeneeskunde gecombineerd om efficiënte ophoping van fotosensibilisatoren in kankercellen (*in vitro*) of op de tumorplaats (*in vivo*) te bereiken, voordat ze selectief worden geactiveerd doormiddel van bestraling met licht. Wij bieden een alternatief voor de compliceerde synthese en lage reproduceerbaarheid van nanodragers die bestaan uit meerdere componenten, wiens eigenschappen vaak leiden tot lage lading-efficiëntie van geneesmiddelen. Hierdoor kunnen de klinische toepassingen dramatisch beperkt worden, terwijl de verbindingen in preklinische tests veelbelovend leken te zijn. Binnen het onderzoek dat beschreven wordt in dit proefschrift hebben we ons gericht op het ontwerp en de synthese van kleine, moleculaire fotosensibilisatoren op basis van d^8 overgangsmetaalverbindingen van gecyclometalleerde, tetradentate liganden. Verder ontdekten we dat deze moleculen kunnen worden gebruikt om een moleculaire fotosensibilisator-zelfassemblage-nanosysteem (MoPSAN) te ontwikkelen, op basis van de supramoleculaire samenstelling van deze moleculen via metallofiele metaal...metaal (M...M) interacties. Deze nanosystemen vertonen een hoge medicijnbelading, hoge cellulaire opname *in vitro* en hoge

accumulatie in de tumor *in vivo*, en uitstekende anti-kanker PDT effecten zowel *in vitro* als *in vivo*.

In **hoofdstuk 2** beschrijven we twee isomeren van een gecyclometalleerd palladium(II)verbinding en hebben we hun antikanker PDT eigenschappen via verschillende fotofysische en fotobiologische methoden vergeleken. Het eerste isomeer **PdL¹**, met een N[^]N[^]C[^]N-coördinatie, vertoonde een uitstekende kwantumopbrengst van de productie van singletzuurstof (0.89) bij bestraling met blauw licht, wat ook resulteerde in hoge foto-indices bij blauw lichtactivatie van het isomeer in menselijke kankercellen. Daarentegen had het tweede isomeer **PdL²**, gekenmerkt door een N[^]N[^]N[^]C-coördinatie, zowel een lage absorptie-efficiëntie van blauw licht alsook een lage kwantumopbrengst van de vorming van singletzuurstof (0.38), wat *in vitro* een verwaarloosbare activering van **PdL²** door blauw licht opleverde. DFT-berekeningen toonden aan dat de hogere lichtabsorptie in het blauwe gebied van **PdL¹**, en dus de lagere HOMO-LUMO energiekloof, veroorzaakt werd door de kleinere afstand tussen de elektronenrijke, gecyclometalleerde aromatische ring en de stikstofbrug van het ligand, terwijl in **PdL²** beide aromatische ringen naast de aminebrug elektronenarm zijn, waardoor de HOMO-energie lager uitvalt. Deze resultaten tonen aan dat de positie van de koolstof-metaalbinding in de coördinatiesfeer van fotoactieve organometaalprogeneesmiddelen kan worden gebruikt om de energiekloof tussen hun grensorbitalen af te stemmen, en daarmee ook de absorptie in het zichtbare gebied van het spectrum, wat essentieel is in PDT-toepassingen.

De deprotonering van de niet-gecoördineerde NH-brug in de palladiumcomplexen beschreven in **hoofdstuk 2** resulteerde in neutrale metaalcomplexen die onoplosbaar zijn in water, waardoor hun toepassing voor kankerbehandeling *in vivo* beperkt was. In **hoofdstuk 3** beschrijven we de resultaten van methylering van deze aminebrug om dit probleem te vermijden. Drie in water oplosbare analoge palladiumcomplexen werden met succes gesynthetiseerd: twee gecyclometalleerde isomeren [**PdMeL¹**]**OAc** (N[^]N[^]C[^]N coördinatie) en [**PdMeL²**]**OAc** (N[^]N[^]N[^]C coördinatie), en een referentie-tetrapyridylcomplex [**Pd(Mebbp₄)**](**OAc**)₂ (N[^]N[^]N[^]N coördinatie). Alle complexen zijn oplosbaar in water. [**PdMeL¹**]**OAc** heeft vergelijkbare fotofysische en fotobiologische eigenschappen als **PdL¹**, maar daarnaast ookeen sterk blauw licht geactiveerd PDT-effect in een muizen-tumor xenotransplantaat, hetgeen een veelbelovend resultaat is voor een palladium-gebaseerde fotosensibilisator voor toepassing in PDT. Opmerkelijk in dit werk is de ontdekking dat cyclometallering van een palladiumcomplex de zelfassemblage van het complex tot nanostaafjes mogelijk maakt via metallofiele Pd...Pd

interacties. Dit proces is verder afhankelijk van de eiwitten in het celmedium waarin de verbindingen opgelost worden. Een belangrijke waarneming is dat endocytose een cruciale rol speelt bij de cellulaire opname van deze aggregaten, wat een hogere cellulaire opname van de gecyclometallegeerde complexen veroorzaakt in vergelijking met conventionele niet-gecyclometallegeerde tetrapyridylverbinding $[\text{Pd}(\text{Mebppy})](\text{OAc})_2$. Er wordt al jaren gedebatteerd over de rol van de eiwitcorona in medicijnafgiftesystemen, maar de eiwitafhankelijke zelfaggregatie van een zelfassemblerend medicijn was nog niet eerder gedocumenteerd. Dit werk laat verder zien dat geneesmiddelen die zichzelf assembleren tot nanostaafjes een uitstekende medicijnpenetratie in 3D-tumormodellen hebben, wat een nieuwe strategie kan opleveren door metallodrugs te combineren met nanogeneeskunde, zoals verder is besproken in **hoofdstuk 5**.

In het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 4** is gebruik gemaakt van dezelfde liganden als beschreven in **hoofdstuk 3**, maar is het palladium vervangen door platina. Hierdoor konden we aantonen dat de platina(II)-complexen $[\text{PtMeL}^1]\text{OAc}$ en $[\text{PtMeL}^2]\text{OAc}$ beide sterke metallofile interacties vertoonden, wat ook hier resulteerde in de zelfassemblage van nanoaggregaten in celkweekmedium. Hoewel allebei de Pd^{2+} - en de Pt^{2+} -reeksen zelfassemblage vertoonden via metallofile interacties en celafhankelijke cytotoxiciteit vertoonden in het donker, bleken hun fotochemische eigenschappen dramatisch te verschillen. De uitstekende PDT-eigenschappen en verwaarloosbare emissie van de palladiumaggregaten werden in de platinaserie vervangen door slechte PDT-eigenschappen maar wel een naar rood-verschoven absorptie- en dieprode emissie-eigenschappen, waardoor deze aggregaten kunnen worden gebruikt in microscopie in plaats van fototherapie. De verschillende fotochemische eigenschappen van de platina- en de palladiumcomplexen moeten afkomstig zijn vanuit hun verschillende relatieve deactiveringssnelheden van de aangeslagen toestand, zowel in de aggregaten als in de monomere vormen. Fosforescentie en stralingsloze interne conversie naar de singlet grondtoestand zijn kwantumchemisch verboden processen die sterk afhankelijk zijn van spin-baan koppeling, die sterker is voor platina(II)- dan voor palladium(II)-ionen. Over het algemeen is de Pt(II) $5d_z^2$ -orbitaal hoger in energie dan de Pd(II) $4d_z^2$ -orbitaal, wat ertoe leidt dat Pt(II) een sterkere invloed vertoont dan Pd(II) op de moleculaire grensorbitalen, de efficiëntie van intersysteemovergang, en de $T^1 \rightarrow S^0$ stralingsverval, waardoor de platinacomplexen een intensere fosforescentie krijgen. Deze fosforescentie, gelegen in het dieprode gebied van het spectrum, stelde ons in staat de opname en lokalisatie van deze supramoleculaire nanodeeltjes in cellen te bestuderen. Zo werd er gevonden dat in A549-cellen

de dieproud-emitterende nanoaggregaten van **[PtMeL₂]OAc** zich in de mitochondriën ophopen, wat ook werd bevestigd door elektronenmicroscopie vanwege de hoge elektronendichtheid van platinaverbindingen. Over het geheel genomen toonde deze reeks polypyridyl-platinacomplexen nieuwe perspectieven bij het gebruik van de metallofiele interacties om supramoleculaire nanosystemen te bouwen die, bij hoge concentratie, kankercellen kunnen doden, maar bij lage concentratie kunnen worden gebruikt als dieprode kleurstoffen voor verschillende organellen, in dit geval de mitochondriën.

In **hoofdstuk 5** beschrijven we een bis-gecyclometalleerd palladiumcomplex, **PdL³**, dat het niet alleen mogelijk maakte om de absorptie van het complex verder te verschuiven naar langere golflengten, maar ook om de lading verder te verlagen zodat er een neutraal complex gevormd wordt met sterke Pd...Pd interacties. Er werd verder aangetoond dat **PdL³** zichzelf assembleert als nanoaggregaten in celkweekmedium, maar ook verbeterde PDT-eigenschappen heeft in vergelijking met het mono-gecyclometalleerde complex **PdL¹**. Naast het feit dat deze verbinding geactiveerd kan worden met groen licht in plaats van blauw licht, als gevolg van de verdere destabilisatie van de HOMO door de tweede Pd-C binding, bleek het ook bijzonder cytotoxisch onder zuurstofarme omstandigheden, met fotoindices tot en met 70 in huidmelanoomcellijnen.

Deze uitstekende reactiviteit was te danken aan een PDT type I mechanisme, dat minder afhankelijk is van de zuurstofconcentratie dan PDT type II. **PdL³** diende als een “proof-of-concept” voor het MoPSAN-concept, waarbij een PDT-fotosensibilisator zichzelf assembleert tot tumorgerichte nanostructuren *in vivo* met behulp van het EPR-effect. Dicht opelkaarzittende nanodeeltjes werden gevonden met elektronenmicroscopie (EM) in plasma na intraveneuze injectie van het complex in muizen, wat aantoont dat zelfassemblage in biologische omstandigheden optreedt. Vervolgens toonden ICP-OES metingen significante ophoping van **PdL³** in de tumor aan, met een uitzonderlijke hoge medicijnafgifte tot 10.2% ID/g. EM-beelden van tumorplakjes bewezen opnieuw de accumulatie van zelf-geaggregeerde nanodeeltjes van **PdL³** in de solide tumor. Op basis van deze resultaten concluderen we dat de supramoleculaire metallofiele Pd...Pd interactie een hoog potentieel heeft om 1) supramoleculaire nanodragers te bouwen met verbeterde ophoping in de tumor via het EPR-effect, en 2) PDT-fotosensibilisatoren te genereren die hun fototoxische eigenschappen behouden onder zuurstofarme omstandigheden.

Ten slotte rapporteren we in **hoofdstuk 6** de chemie van gecyclometalleerde Au(III)-verbindingen. Hoewel Au(III) en Pt(II) iso-elektronisch zijn, hebben ze verschillende

eigenschappen vanwege de hogere lading en elektronegativiteit van Au(III) (2.4 voor Au en 2.2 voor Pt). Over het algemeen verlaagt cyclometallering in polypyridyl-metaalcomplexen hun moleculaire lading in vergelijking met conventionele stikstofcoördinatie, hierdoor wordt de lipofiliciteit van deze verbindingen danook aanzienlijk beïnvloedt. Zoals besproken is in **hoofdstuk 2**, beweren veel publicaties dat de hogere lipofiliciteit van gecyclometallegeerde complexen de cellulaire opname stimuleert via passieve transportatie door het celmembraan, wat kan leiden tot betere therapeutische effecten bij lagere doses van een verbinding, maar dat dit ten koste gaat van de kankerselectiviteit. Verder stabiliseert cyclometallering de Au(III)-oxidatietoestand, waardoor deze goudverbindingen minder snel worden gereduceerd door biologische thiolgroepen als ze het cytosol hebben bereikt. We onderzochten de coördinatie van een aantal tetrapyridyl liganden met goud(III)-ionen en in **hoofdstuk 6** beschrijven we de toevallige ontdekking dat een van deze liganden bij voorkeur aan het Au(III)-centrum bindt via 'rollover cyclometallation' waarbij een bisgecyclometallegeerd goud(III)-complex **[Au(biqbpy1)]Cl** ($C^{\wedge}N^{\wedge}N^{\wedge}C$) gevormd wordt, terwijl het andere ligand coördineert met vier stikstofatomen om het traditionele tetrapyridylcomplex **[Au(biqbpy2)]Cl** ($N^{\wedge}N^{\wedge}N^{\wedge}N$) te vormen. Interessant is dat beide kationische complexen een lading van 1+ hebben, wat veroorzaakt wordt doordat de bruggende amines in **[Au(biqbpy2)]⁺** gedeprotoneerd zijn, in tegenstelling tot de bisgecyclometallegeerd verbinding **[Au(biqbpy1)]⁺** waarin de aminebruggen geprotoneerd bleven. Deze twee verbindingen bieden daarom de unieke mogelijkheid om gecyclometallegeerde versus niet-gecyclometallegeerde Au(III)-complexen te vergelijken zonder de algehele lading van het complex te veranderen. We ontdekten dat de roll-over gecyclometallegeerde verbinding **[Au(biqbpy1)]Cl** zeer stabiel is in reducerende biologische omstandigheden, maar dat het ook nanodeeltjes vormt in celmedium, waardoor het een 6-voudige efficiëntere opname in A549-kankercellen had dan de tetrapyridylverbinding **[Au(biqbpy2)]Cl**, die geen nanodeeltjes vormde maar eerder reductie ondergaat in celweekmedium.

De identieke lading maar verschillende aggregatie-eigenschappen van **[Au(biqbpy1)]Cl** en **[Au(biqbpy2)]Cl** bieden een nieuw perspectief op de verbeterde cellulaire opname van gecyclometallegeerde goudcomplexen. Zoals duidelijk is aangetoond voor de Pd(II)- en Pt(II)-gecyclometallegeerde complexen beschreven in eerdere hoofdstukken van dit proefschrift, kunnen deze nano-aggregaten actief transport activeren, zoals endocytose, wat doorgaans efficiënter is dan passief transport. Bovendien is **[Au(biqbpy1)]Cl** stabiel in biologische omstandigheden en vertoonde het daarom een verminderde TrxR-remming in vergelijking met

[Au(biqbpy2)]Cl, die bij intracellulaire reductie de bekende TxrR-remmende Au^+ als vrije ionen vrijgaf. De resulterende cytotoxiciteit in kankercellen was lager voor **[Au(biqbpy1)]Cl** dan voor **[Au(biqbpy2)]Cl**, maar de toxiciteit bij niet-kankercellen was ook relatief veel lager, waardoor de selectiviteit voor kankercellen hoger was dan **[Au(biqbpy2)]Cl**. Ondertussen vertoonden beide complexen een vergelijkbaar hoog kaliumkanaalbindend vermogen, wat mogelijk toegeschreven zou kunnen worden aan hun identieke lading en vergelijkbare moleculaire vorm. Hun kaliumkanaalbindingsvermogen was ook hoger dan dat van de losse tetrapyridyliganden, wat suggereert dat metaalcomplexering een alternatieve methode zou kunnen zijn om de kaliumkanaalactiviteit met behulp van kleine moleculen te reguleren. Al met al leverde de vergelijking van deze isomeren, vanuit chemisch en biologisch oogpunt, nieuwe inzichten op met betrekking tot het gebruik van cyclometallering bij het ontwerp voor geneesmiddelen om de balans tussen stabiliteit, aggregatie, toxiciteit en eiwitremming van goud(III) antikanker complexen te verbeteren.

In het kort, de resultaten die in dit proefschrift worden beschreven overbruggen de gebieden van metallomedicijnen tegen kanker, fotodynamische therapie, celbeeldvorming, luminescerende materialen en nanogeneeskunde. Door gebruik te maken van cyclometallering en de supramoleculaire metallofiele M...M interactie, was het mogelijk om de fantastische impact aan te tonen die metaalcomplexen kunnen hebben op de ontwikkeling van toekomstige antikankermedicijnen en nanomaterialen.