



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Ruthenium-peptide conjugates for targeted phototherapy

Zhang, I.

Citation

Zhang, I. (2023, July 4). *Ruthenium-peptide conjugates for targeted phototherapy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3628436>

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/1887/3628436>

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

Samenvatting

In dit proefschrift is een serie van ruthenium(II)-polypyridine-peptideverbindingen beschreven die verschillen in hun polypyridineligand, peptidesequentie en/of de chiraliteit van het metaalcentrum of de aminozuren. Van deze complexen zijn hun structurele, fotochemische, *in vitro* cellulaire en *in vivo* antitumoreigenschappen en biodistributie bestudeerd en onderling met elkaar vergeleken. De coördinatie van de histidine-stikstof of methionine-zwavel donor aan een racemische ruthenium(II) verbinding resulteert in de conjugaten, echter is HPLC zuivering vereist voor het scheiden van de verschillende diastereomeren. Onze strategie, die berust op de directe coördinatie van een bidentaat peptide aan een metaalcentrum om een metaal-bevattend cyclisch peptide te verkrijgen, is een alternatief voor de traditionele conjugatiestrategie op basis van de vorming van een covalente band op een ligand. Wanneer de juiste aminozuurresiduen (histidine of methionine) in een peptidesequentie voorkomen, kan de metaal-peptideverbinding gesynthetiseerd worden onder relatief milde reactiecondities.

De coördinatie van een peptide aan een metaal-bevattend medicijn heeft verschillende doeleinden. Ten eerste voorkomt het peptide dat een cytotoxische metaalverbinding (bijvoorbeeld $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ in **Hoofdstukken 3 en 5**) kan binden aan biomoleculen, waardoor de biocompatibiliteit wordt vergroot en wat resulteert in een lagere systemische toxiciteit in het donker. Wanneer er wordt beschenen met licht dissocieert het peptide van $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-MRGDH-NH}_2)]\text{Cl}_2$ of $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-MRGDM-NH}_2)]\text{Cl}_2$ in twee goed-gedefinieerde fotochemische stappen, waardoor de toxische rutheniumverbinding vrijkomt en met hoge efficiëntie de kankercellen doodt. Ten tweede functioneert het peptide als een sturend middel naar de tumor, omdat het een sterke binding aangaat met integrine (bijvoorbeeld $K_a = 1,64 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ voor de binding van Λ - $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-MRGDH-NH}_2)]\text{Cl}_2$ aan $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, **Hoofdstuk 3**). Doordat er receptor-gemedieerde opname plaatsvindt laat de ruthenium-peptideverbinding een hogere efficiëntie van opname zien *in vitro* dan het complex dat niet gebonden is aan het peptide (**Hoofdstuk 2**). Daarnaast is een hoge intracellulaire rutheniumaccumulatie waargenomen in cellijnen die integrines $\alpha_v\beta_3$ en $\alpha_v\beta_5$ tot overexpressie brengen (bijvoorbeeld humane primaire glioblastoma U87MG cellen). Ten derde, en het meest belangrijke: de ruthenium-peptideverbindingen vertonen lage toxiciteit in diermodellen en veelbelovende licht-geactiveerde toxiciteit tegen hersentumoren volgens de *in vivo* studies met een subcutaan-glioblastoma naakte-muismodel (**Hoofdstuk 3**) en een zebra-vis-glioblastoma-xenotransplantaatmodel (**Hoofdstuk 4**). Accumulatie van de verbinding vindt

plaats in de tumor, wat laat zien dat de verbinding een uitstekend vermogen heeft om de bloed-hersenbarrière (BHB) te passeren.

De invloed van de coördinerende aminozuurresiduen van de peptidesequentie op de fotochemische en biologische eigenschappen van de rutheniumverbindingen is bestudeerd. Wanneer een racemische verbinding zoals *cis*-[Ru(Ph₂phen)₂Cl₂] met verschillende peptiden reageert (Ac-HRGD_H-NH₂, Ac-MRGD_H-NH₂ en Ac-MRGD_M-NH₂) resulteert dit in [Ru(Ph₂phen)₂(Ac-HRGD_H-NH₂)]Cl₂, [Ru(Ph₂phen)₂(Ac-MRGD_H-NH₂)]Cl₂ en [Ru(Ph₂phen)₂(Ac-MRGD_M-NH₂)]Cl₂ met een verhouding tussen de Λ en Δ isomeren van respectievelijk 1:2, 1:1.5 en 1:1 (**Hoofdstuk 4**). De hogere rigiditeit van de histidineresiduen ten opzichte van de methionineresiduen,¹ lijkt te resulteren in een hogere fractie van het Δ-isomeer, terwijl de hogere flexibiliteit van de methionineresiduen in de verbinding [Ru(Ph₂phen)₂(Ac-MRGD_M-NH₂)]Cl₂ resulteert in afwezigheid van een voorkeur voor een specifieke diastereomeer. Wanneer één van de enantiozuivere peptides L (Ac-MRGD_M-NH₂, afgekort **p1**), D (Ac-mrGdm-NH₂, **p2**), of L/D (Ac-MrGdM-NH₂, **p3**) gecoördineert aan racemisch *cis*-[Ru(Ph₂phen)₂Cl₂], is de verhouding tussen de Λ en Δ isomeren van de resulterende ruthenium-peptideverbindingen [Ru(Ph₂phen)₂(**p1**)]Cl₂, [Ru(Ph₂phen)₂(**p2**)]Cl₂ en [Ru(Ph₂phen)₂(**p3**)]Cl₂ ook verschillend, zoals beschreven in **Hoofdstuk 5**. De gevonden 1:1 verhouding van Δ/Λ isomeren van [Ru(Ph₂phen)₂(**p1**)]Cl₂ en [Ru(Ph₂phen)₂(**p2**)]Cl₂ is in overeenstemming met het gebruik van racemisch *cis*-[Ru(Ph₂phen)₂Cl₂] en de peptides **p1** en **p2** die elkaars spiegelbeeldisomeren zijn. Voor [Ru(Ph₂phen)₂(**p3**)]Cl₂, is een 1:2 verhouding van de Δ en Λ diastereomeren gevonden, wat bevestigt dat er een significante invloed is van de peptidestructuur op de configuratie van het metaalcentrum.

De fotochemie en de cellulaire eigenschappen van de tris(bidentate) octaëdrische complexen [Ru(N-N)₂(peptide)]²⁺ beschreven in dit proefschrift wordt sterk beïnvloed door de structuur van de bis(amine) liganden N-N. De verbindingen met twee bpy of twee Ph₂phen liganden en de peptidesequentie Ac-HRGD_H-NH₂ (**Hoofdstuk 2**) gedragen zich als PDT-verbindingen die singlet zuurstof genereren (¹O₂) en fosforescent zijn wanneer ze beschienen worden met zichtbaar licht. Het gebruik van de meer sterisch gehinderde dmbpy liganden resulteert in een PACT-rutheniumcomplex. Naast de invloed van de sterische hindering van de bis(amine) liganden, bleek ook het metaal-bindende aminozuurresidu van belang te zijn. Zoals beschreven in **Hoofdstuk 4**, volgen de drie verbindingen [Ru(Ph₂phen)₂(Ac-HRGD_H-NH₂)]Cl₂, [Ru(Ph₂phen)₂(Ac-MRGD_H-NH₂)]Cl₂ en [Ru(Ph₂phen)₂(Ac-MRGD_M-NH₂)]Cl₂, die verschillen in de aminozuurresiduen die gebonden zijn aan het metaal, verschillende licht-

geactiveerde mechanismes. In de serie $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-HRGDH-NH}_2)]\text{Cl}_2$, $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-MRGDH-NH}_2)]\text{Cl}_2$ en $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-MRGDM-NH}_2)]\text{Cl}_2$ vermindert het energieverval tussen de $^3\text{MLCT}$ en ^3MC aangeslagen toestanden ($\Delta E = E(^3\text{MC}) - E(^3\text{MLCT})$), alsook de vorming van singlet zuurstof ($^1\text{O}_2$) en superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$), terwijl het kwantumrendement van de fotosubstituties toeneemt. Tegelijkertijd laten studies naar de cytotoxiciteit onder verschillende zuurstofconcentraties zien dat $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-HRGDH-NH}_2)]\text{Cl}_2$ alle fototoxiciteit verliest in zuurstofarme (1% O_2) condities (PI = 1.3 vs. 12.1 onder normoxische condities), dat $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-MRGDH-NH}_2)]\text{Cl}_2$ het grootste deel van zijn fototoxiciteit kwijtraakt (PI = 1.9 vs. 11.9 onder normoxische condities), terwijl $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-MRGDM-NH}_2)]\text{Cl}_2$ een significante hoeveelheid van zijn fototoxiciteit behoudt (PI = 4.0 vs. 8.5 onder normoxische condities). Deze resultaten laten zien dat vervanging van een histidine door een methionine in de coördinatie van een ruthenium-peptideverbinding resulteert in de verandering van een PDT-verbinding ($[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-HRGDH-NH}_2)]\text{Cl}_2$) naar een PACT-verbinding ($[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-MRGDM-NH}_2)]\text{Cl}_2$). Samenvattend: het gebruik van methionineresiduen wordt geadviseerd wanneer het doel is om PACT-ruthenium-peptideverbindingen te verkrijgen.

De locatie van intracellulaire ophoping van ruthenium-peptideverbindingen is afhankelijk van meerdere factoren. Ten eerste is dit afhankelijk van de relatieve expressie van de doelwitreceptoren; zo beïnvloeden bijvoorbeeld integrine $\alpha_v\beta_3$ en integrine $\alpha_v\beta_5$ de efficiëntie van de opname van de ruthenium-peptideverbindingen, wat een sterke aanwijzing is dat de serie van Ru-RGD-verbindingen opgenomen worden via receptor-gemedieerde processen. Zoals beschreven in **Hoofdstuk 2** (Figuur 2.2) wordt de rutheniumaccumulatie voor bijvoorbeeld de Δ/Λ mengsels van $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-HRGDH-NH}_2)]\text{Cl}_2$ lager volgens de serie A549-Hypo>A549-Norm>MCF-7-Hypo>MCF-7-Norm, wat duidelijk in overeenstemming is met de trend in de cellulaire expressie van integrine $\alpha_v\beta_3$ in deze cellijnen. Een studie van de opname van enantiozuivere Δ - of Λ -isomeren van $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-MRGDH-NH}_2)]\text{Cl}_2$ in U87MG, PC-3 en MCF-7 (**Hoofdstuk 3**, Figuur 3.5) bevestigde dat in cellijnen met hogere integrine- $\alpha_v\beta_3$ of integrine- $\alpha_v\beta_5$ expressie resulteert in een hogere efficiëntie van de opname van de verbinding.

Verder is aangetoond dat de lipofiliciteit van de rutheniumverbindingen een belangrijke eigenschap is voor cellulaire opname. De cellulaire opname van $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-HRGDH-NH}_2)]\text{Cl}_2$ is veel hoger dan dat van $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Ac-HRGDH-NH}_2)]\text{Cl}_2$ (**Hoofdstuk 2**), wat erop duidt dat het lipofiele ligand Ph_2phen ervoor zorgt dat het rutheniumcomplex efficiënter

opgenomen wordt dan de vergelijkbare bpy-verbinding. Naast de efficiëntie van opname verschilt ook de intracellulaire lokalisatie van de twee verbindingen. De co-lokalisatiestudie liet zien dat **[Ru(Ph₂phen)₂(Ac-HRGDH-NH₂)]Cl₂** zich voornamelijk in de lysosomen bevindt, terwijl **[Ru(bpy)₂(Ac-HRGDH-NH₂)]Cl₂** vooral ophoopt in het Golgiapparaat. De lipofiliciteit van het peptide beïnvloedt ook de opname van de rutheniumcomplexen zoals beschreven in **Hoofdstuk 3** voor de relatief lipofiele peptidesequentie Ac-MRVDH-NH₂ vergeleken met Ac-MRGDH-NH₂. De corresponderende ruthenium-peptideverbinding **[Ru(Ph₂phen)₂(Ac-MRVDH-NH₂)]Cl₂** vertoonde een relatief hoge efficiëntie van opname en *in vitro* cytotoxiciteit ondanks de verminderde affiniteit voor integrine $\alpha_{11b}\beta_3$.