



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).

## 总结

本博士论文介绍了一系列可光激活的钌(II)多吡啶-多肽螯合物 (Ru(II) polypyridine-peptide conjugates)。作者基于不同的多吡啶配体、多肽序列、金属中心以及氨基酸的手性,对它们的结构、光化学性质、体外细胞行为以及体内抗肿瘤效率和药物分布等进行了研究和比较。研究表明,外消旋钌(II)前体与氨基酸残基(组氨酸(histidine)或甲硫氨酸(methionine))在相对温和的条件下可直接配位形成螯合物。尽管需要高效液相色谱(High-performance liquid chromatography, HPLC)分离产物的不同非对映异构体,这种双齿肽(bidentate peptide)与钌(II)多吡啶直接配位形成金属环肽的策略,为传统的在配体上共价修饰多肽的方法提供了替代方案。原则上,当多肽序列中包含适当的氨基酸残基(即组氨酸或甲硫氨酸)时,钌-多肽螯合物即可通过本文中所述相对温和的反应条件制备而得。

正如本文所讨论的,将多肽螯合到金属药物上实现了以下几个目的:首先,多肽改善了金属化合物的生物相容性,为较强毒性的钌化合物提供了保护屏障(例如,第3章和第5章中的 $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ ),降低了其黑暗条件下的毒性。随后,在可见光的照射下, $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-MRGDH-NH}_2)]\text{Cl}_2$ 或 $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-MRGDM-NH}_2)]\text{Cl}_2$ 的多肽可通过两步光化学解离,释放出能高效杀死癌细胞的钌化合物;其次,特定的多肽序列具有肿瘤靶向性。蛋白结合实验结果表明,钌(II)-多肽螯合物与目标蛋白整合素(Integrin)具有较强的相互作用(例如, $\Lambda$ - $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-MRGDH-NH}_2)]\text{Cl}_2$ 与整合素 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ 的结合常数 $K_a$ 可以达到 $1.64 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ,见第3章)。基于此,相比未与多肽螯合的钌化合物,钌-多肽螯合物在目标受体表达水平高的癌细胞中表现出更高的摄取效率(见第2章)。此外,在目标蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_5$ 表达水平更高的细胞系(例如人原发性胶质母细胞瘤U87MG细胞)中,细胞内的钌积累量更高。这些结果表明这类螯合物作为可光激活的金属药物,可以对特定细胞系提供靶向性治疗。更为重要的是,根据皮下胶质母细胞瘤裸鼠模型(第3章)和斑马鱼胶质母细胞瘤原位移植模型的体内研究,钌-多肽螯合物在动物体内表现出较低的毒性,而在光激活下表现出优异的抗肿瘤活性(第4章)。体内实验结果表明螯合物可在肿瘤中有效积累,特别是针对原位脑瘤,螯合物表现出了出色的穿透血脑屏障(Blood-Brain Barrier)能力。

多肽除了影响金属化合物的光化学和生物学性质以外,对钌-多肽螯合物的构型也有一定的影响。当外消旋前体 $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2\text{Cl}_2]$ 与不同多肽序列,即Ac-HRGDH-NH<sub>2</sub>, Ac-MRGDH-NH<sub>2</sub>和Ac-MRGDM-NH<sub>2</sub>配位时,得到的钌-多肽螯合物 $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-HRGDH-NH}_2)]\text{Cl}_2$ 、 $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-MRGDH-NH}_2)]\text{Cl}_2$ 和 $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-MRGDM-NH}_2)]\text{Cl}_2$ 中 $\Lambda$ -和 $\Delta$ -异构体之间的比例分别为1:2、1:1.5和1:1(见第4章)。

由于组氨酸残基比甲硫氨酸残基的刚性更强，因此两个组氨酸作为配位基团促进了更高比例的  $\Delta$ -异构体的形成。然而，对于  $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-MRGDM-NH}_2)]\text{Cl}_2$  螯合物，它的两种非对映异构体几乎没有能量的倾向性，因此  $\Lambda$ - 和  $\Delta$ - 异构体的比例为 1:1，与前驱体一致。此外，当不同手性的多肽，包括 L 型 (Ac-MRGDM-NH<sub>2</sub>，称为 **p1**)、D 型 (Ac-mrGdm-NH<sub>2</sub>，**p2**) 或 L/D 混合的 (Ac-MrGdM-NH<sub>2</sub>，**p3**) 多肽与外消旋前体 *cis*- $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2\text{Cl}_2]$  配位时，形成的钌-多肽螯合物  $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\mathbf{p1})]\text{Cl}_2$ ， $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\mathbf{p2})]\text{Cl}_2$  和  $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\mathbf{p3})]\text{Cl}_2$  中  $\Lambda$ - 和  $\Delta$ - 异构体之间的比率也不尽相同 (见第 5 章)。  $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\mathbf{p1})]\text{Cl}_2$  和  $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\mathbf{p2})]\text{Cl}_2$  的  $\Lambda/\Delta$  异构体比例为 1:1，此结果与外消旋前体和镜像肽 **p1** 和 **p2** 的结构相对应。而对于  $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\mathbf{p3})]\text{Cl}_2$ ， $\Delta$  和  $\Lambda$  非对映异构体的比例则为 1:2，表明除了配位残基，多肽中其它氨基酸对金属中心构型也有显著影响。

在本论文讨论的一系列三配体 (双齿) 八面体螯合物  $[\text{Ru}(\text{N-N})_2(\text{peptide})]^{2+}$  中，螯合物的光化学性质和其在细胞中的行为很大程度上受多吡啶配体 (N-N) 结构的影响。当具有两个 bpy (2,2'-bipyridine) 或两个 Ph<sub>2</sub>phen (4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline) 配体的钌化合物与多肽序列 Ac-HRGD<sub>H</sub>-NH<sub>2</sub> (见第 2 章) 配位时，形成的螯合物表现出光动力治疗 (photo dynamic therapy, PDT) 效果，它们在可见光照射下可产生单线态氧 (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) 和磷光 (phosphorescence)。然而，如果换成空间位阻更大的 dmbpy (6,6'-Dimethyl-2,2'-bipyridine) 配体时，获得的螯合物则表现出光活化化疗 (photoactivated chemotherapy, PACT) 效果。除配体的位阻效应以外，多肽序列中负责与金属钌配位的氨基酸种类也对螯合物的性质有显著影响。如第 4 章所述，与三种不同氨基酸配位形成的螯合物： $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-HRGD}_H\text{-NH}_2)]\text{Cl}_2$ ， $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-MRGD}_H\text{-NH}_2)]\text{Cl}_2$  和  $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-MRGD}_M\text{-NH}_2)]\text{Cl}_2$  遵循不同的光活化途径，它们的 <sup>3</sup>MLCT 态 (Metal-to-ligand charge transfer state) 和 <sup>3</sup>MC 态 (Metal-centered state) 之间的能量差 ( $\Delta E = E(^3\text{MC}) - E(^3\text{MLCT})$ ) 依次减小，单线态氧 (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) 和超氧自由基 (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) 的量子产率也依次减小；相反地，相应多肽配体的解离效率则依次增加。在低氧 (1% O<sub>2</sub>) 和常氧 (21% O<sub>2</sub>) 条件下的细胞毒性研究表明， $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-HRGD}_H\text{-NH}_2)]\text{Cl}_2$  在低氧条件下几乎丧失全部光诱导毒性 (光毒性指数：1.3 (低氧)；12.1 (常氧))， $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-MRGD}_H\text{-NH}_2)]\text{Cl}_2$  在低氧条件下的光毒性也很有限 (光毒性指数：1.9 (低氧)；11.9 (常氧))，而  $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-MRGD}_M\text{-NH}_2)]\text{Cl}_2$  则能在低氧条件下保持较高的光诱导毒性 (光毒性指数：4.0 (低氧)；8.5 (常氧))。这些结果表明，将钌-多肽螯合物的配位点从组氨酸残基改变为甲硫氨酸残基，可成功将该螯合物由 PDT 化合物转变为 PACT 化合物。因此，未来如果有研究者想开发更多的氨基酸直接配位的钌-多肽螯合物用于 PACT，作者建议使用甲硫氨酸作为配位氨基酸。

本论文的实验结果表明钌-多肽螯合物的细胞摄取和细胞内的积累量受多种因素的影响。首先，靶向受体（即整合素  $\alpha_v\beta_3$  和整合素  $\alpha_v\beta_5$ ）的表达水平显著影响了钌-多肽螯合物的摄取效率，表明摄取过程由目标受体介导。如第 2 章所示（图 2.2），对比不同的细胞系，化合物  $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-HRGDH-NH}_2)]\text{Cl}_2$  在细胞内的钌积累量由高到低依次为：A549-Hypo>A549-Norm>MCF-7-Hypo>MCF-7-Norm，该结果符合这些细胞系中整合素  $\alpha_v\beta_3$  表达水平的趋势。类似地，在不同细胞系 U87MG、PC-3 和 MCF-7 中，对纯化的  $\Delta$ -或  $\Lambda$ - $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-MRGDH-NH}_2)]\text{Cl}_2$  同分异构体进行细胞摄取的研究结果表明（第 3 章，图 3.5），对于整合素  $\alpha_v\beta_3$  和  $\alpha_v\beta_5$  表达水平更高的细胞系，钌在细胞内有更高的积累量。

除了靶向受体的表达，钌-多肽螯合物的亲脂性对于细胞摄取效率也很重要。在同样的条件下，亲脂性更强的  $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-HRGDH-NH}_2)]\text{Cl}_2$  在癌细胞内的积累量要远高于亲脂性较弱的  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Ac-HRGDH-NH}_2)]\text{Cl}_2$ （第 2 章）。这两种螯合物不仅摄取效率不同，在细胞内的位置分布也有差异。共定位（co-localization）研究结果表明， $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-HRGDH-NH}_2)]\text{Cl}_2$  主要集中在溶酶体，而  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Ac-HRGDH-NH}_2)]\text{Cl}_2$  似乎主要位于高尔基体区域。此外，多肽的亲脂性也对细胞摄取效率有影响。如第 3 章所述，当 Ac-MRGDH-NH<sub>2</sub> 被替换为亲脂性更强的多肽序列 Ac-MRV<sub>2</sub>DH-NH<sub>2</sub> 时，相应的钌-多肽螯合物  $[\text{Ru}(\text{Ph}_2\text{phen})_2(\text{Ac-MRV}_2\text{DH-NH}_2)]\text{Cl}_2$  即使与整合素  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  的结合亲和力降低，但仍然在癌细胞中表现出较高的摄取效率和体外细胞毒性。

总而言之，本论文表明，为金属钌化合物配位生物兼容性强，功能靶向性的多肽是提高其作为 PACT 化合物用作临床药物的最有潜力的工具之一。作者希望基于本论文的工作，在不久的将来会有更多特异性靶向肿瘤的钌-多肽螯合物得到开发和研究。

