



Universiteit  
Leiden

The Netherlands

## **Design and synthesis of metal-based chemotherapeutic agents for targeted DNA interactions or DNA repair pathway modulation**

Griend, C.J. van de

### **Citation**

Griend, C. J. van de. (2024, February 27). *Design and synthesis of metal-based chemotherapeutic agents for targeted DNA interactions or DNA repair pathway modulation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3720005>

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/1887/3720005>

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

## Samenvatting

Sinds de ontdekking van cisplatina- en stikstofmosterdderivaten, die beide over prominente antikankereigenschappen beschikken door middel van interacties met DNA, zijn de concepten chemotherapie en DNA-beschadiging nauw met elkaar verweven geraakt. Dit is een belangrijk thema binnen het onderzoek beschreven in dit proefschrift, waarbij het hoofddoel het ontwerpen en synthetiseren van metaalgebaseerde chemotherapeutica is, en het bestuderen van de interacties van deze verbindingen met DNA, zowel op directe wijze als indirect via de fotoactivatie van remmers van de DNA-herstelmechanismen

In Hoofdstuk 2 concentreren we ons op de directe interactie tussen metaalverbindingen en DNA, waarbij we de structuur-activiteitsrelatie onderzoeken voor een reeks d8-metaalcomplexen, afgeleid van de overkoepelende  $[M(H_2bapbpy)]Cl_2$  verbinding ( $H_2bapbpy = 6,6'$ -bis(2''-aminopyridyl)-2,2'-bipyridine). De gesynthetiseerde reeks omvat liganden, gecoördineerd aan palladium(II) of platinum(II). Deze  $H_2bapbpy$ -gebaseerde liganden zijn gemodificeerd aan hun terminale pyridylgroepen met methyl-, methoxy-, chloride- of trifluormethyl substituanten, of de aminebruggen zijn vervangen door thioether-, ether-, methyleen- of carbonylbruggen. De verkregen complexen met  $NH^-$  of  $CH_2$ -bruggen kunnen gemakkelijk in waterige oplossingen worden gedeprotoneerd, wat het mogelijk maakte hun zuurtegraadconstanten ( $pK_a$ ) te bepalen. Daarnaast hebben we de interacties tussen deze complexen en DNA onderzocht in titratie-experimenten. Hieruit bleek dat bij een lage pH-waarde van 4,5-5,0 intercalatie de overheersende bindingswijze was voor de meeste complexen. Bij een hogere pH van 8,0 bleken echter twee opeenvolgende stappen noodzakelijk voor interactie met DNA, waarbij eerst de protonatie van de N- of CH-brug vereist was voordat DNA-intercalatie plaats kon vinden. Bovendien toonden monsters met een hoge DNA-concentratie en een pH van 8,0 UV-vis-spectra die identiek waren aan die van dezelfde monsters bij een pH van 5. Dit duidt erop dat de metaalcomplexen volledig geprotoneerd waren wanneer ze compleet aan het DNA waren gebonden, zelfs in een sterk basische omgeving met een pH-waarde van 8,0. Opmerkelijk was dat de verbindingen met een lage  $pK_a$  bij een pH van 8,0, waarbij effectief protonatie niet kon plaats vinden, geen significante DNA-interacties vertoonden, wat de cruciale rol van de protonatietoestand van de metaalcomplexen voor DNA-intercalatie benadrukt. Uit onze bevindingen bleek dat enkel de bicationische complexen, die volledig geprotoneerd waren, significante interactie met dubbelstrengs DNA vertoonden door middel van intercalatie.

In Hoofdstuk 2 bevestigen de verkregen kristalstructuren opnieuw dat bij coördinatie van  $H_2bapbpy$ -gebaseerde liganden aan metaalcentra, dit leidt tot de vorming van een spiraalvormige chirale structuur van het ligand rond het metaalcentrum. Dit fenomeen is te wijten aan sterische conflicten tussen de terminale pyridines van het ligand,

waarbij één pyridine een bovenpositie inneemt en de ander een onderpositie. In Hoofdstuk 3 wordt de vorming van deze chirale complexen gedetailleerd beschreven, waarbij H<sub>2</sub>bapbpy-gebaseerde liganden aan ruthenium(II) werden gecoördineerd, in tegenstelling tot palladium(II) of platinum(II) d8 complexen. Het octahedrale ruthenium(II)-centrum biedt in vergelijking met d8-metaalcentra twee extra axiale coördinatiesites, waardoor de coördinatie van enantiomeerzuivere liganden aan het rutheniumcentrum mogelijk was. Deze extra chirale liganden boden ons de kans om te onderzoeken of de terminale pyridines van het H<sub>2</sub>bapbpy-derivaat vrij konden wisselen tussen boven- en onderposities in oplossing bij kamertemperatuur, wat zou leiden tot racemisatie. Het complex [Ru(H<sub>2</sub>bapbpy)(MISO)Cl]<sup>+</sup> (MISO = (R)-methyl-p-tolylsulfoxide) toonde via <sup>1</sup>H-NMR de vorming van diastereotopische aromatische protonen. Met temperatuurgevarieerde <sup>1</sup>H-NMR-experimenten is een coalescentie-energie van 44 kJ/mol bepaald voor de omkering van de helicale chiraliteit. Aan de andere kant leidde de verhoogde spanning, geïnduceerd door grotere terminale chinolinegroepen in [Ru(H<sub>2</sub>biqbpy)(DMSO)(Cl)]Cl (H<sub>2</sub>biqbpy = bis(aminoquinoline) bipyridine), tot een coalescentietemperatuur hoger dan 376 K. Dit suggereert dat bij kamertemperatuur geen omkering van helicale chiraliteit plaatsvindt. Bovendien leidde het nog verder verhogen van de sterische spanning door methoxygroepen toe te voegen aan de orthopositie van de stikstofatomen op de terminale pyridylgroepen van H<sub>2</sub>bapbpy tot een ringsluitingsreactie tijdens de synthese poging van [Ru(OMe-H<sub>2</sub>bapbpy)(DMSO)Cl]<sup>+</sup>. Deze reactie resulteerde in het complex [Ru(L'')(DMSO)Cl]Cl, waarbij L'' een asymmetrische polypyridylmacrocyclus is, tetradentaat gecoördineerd aan ruthenium. Deze onverwachte macrocyclisatie bleek specifiek voor ruthenium(II), aangezien deze vorming niet optrad bij soortgelijke reacties van hetzelfde ligand met palladium(II) of rhodium(III).

Een bewezen benadering om de selectiviteit van antikankerstoffen te verhogen, is het gebruik van lichtgeactiveerde chemotherapie. Deze therapievorm kenmerkt zich doordat de chemotherapeutische middelen in het donker inert blijven en pas actief worden bij lokale activering met zichtbaar licht. In Hoofdstuk 4 wordt deze vorm van therapie toegepast om de RAD51-remmer BOCl lokaal te activeren met zichtbaar licht. BOCl, een geavanceerde versie van de bekende RAD51-remmer B02, is ontworpen om de reparatie van dubbelstrengsbreuken via homologe recombinatie te blokkeren. De remmer is gecoördineerd aan het rutheniumplatform [Ru(tpy)(NN)(L)]<sup>2+</sup> (tpy = r 2,2':6',2''-terpyridine, NN = biq (2,2'-biquinoline), dppz (dipyrido[3,2-a:2',3'-c]fenazine) of dppn (benzo[i]dipyrido[3,2-a,2',3'-c]fenazine) en L = de op pyridine gebaseerde RAD51-remmer). De verschillende bidentate liganden in het onderzoek induceren diverse mogelijke uitkomsten. Het bidentate biq ligand induceert sterische spanning binnen het rutheniumcomplex, wat leidt tot een verhoogde fotosubstitutie in vergelijking met de dppz- of dppn-derivaten. Het dppz ligand is bijzonder vanwege zijn vermogen tot DNA-intercalatie, een vorm van DNA-schade. Daarentegen staat het dppn

ligand bekend als een generator van singlet-zuurstof ( $^1\text{O}_2$ ) bij blootstelling aan UV- of zichtbaar licht. Deze liganden zijn geselecteerd omdat hun combinatie met een RAD51-remmer potentieel kan leiden tot een synergetisch effect. Dit effect bestaat uit DNA-schade veroorzaakt door het ruthenium bidentaatspecies, gecombineerd met de foto-geactiveerde remming van homologe recombinatie. Echter, de rutheniumverbindingen met dppz of dppn liganden vertoonden een zeer lage fotosubstitutie rendement, wat waarschijnlijk verhindert dat de B0Cl-remmer wordt vrijgegeven. Anderzijds toonde het complex  $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{biq})(\text{B0Cl})]^{2+}$  een goede fotosubstitutieopbrengst (0,063 in MeCN) voor de licht-geïnduceerde vrijgave van B0Cl bij bestraling met groen licht (505 nm), terwijl het complex in het donker inert bleef. Daarnaast hebben we de licht-geactiveerde cytotoxiciteit (EC50) van dit complex bepaald in twee uveaal melanoom cellijnen, met waarden van respectievelijk 2,7  $\mu\text{M}$  en 3,3  $\mu\text{M}$  voor de OMM2.5- en MM66-celijnen. Belangrijk is dat de verbinding aanzienlijke toxiciteit in het donker vertoonde, wat wijst op een alternatief cytotoxisch werkingsmechanisme. Combinatiebehandelingen bij confocale microscopie experimenten van dit complex en doxorubicine resulteerden in een toename van dubbelstrengsbreuken in het donker, terwijl het aantal RAD51-foci afnam na lichtactivering. Dit is in overeenstemming met de succesvolle fotovrijgave van de B0Cl-remmer. Deze initiële resultaten suggereren dat de B0Cl-remmer met succes werd “caged” en vervolgens vrijgegeven in cellen om de activiteit van homologe recombinatie te verminderen. Het is echter belangrijk op te merken dat de respons op RAD51-remmers kan variëren tussen verschillende celtypen en cel lijnen. Daarom is het van belang om deze vorm van therapie ook andere celtypen, zoals die van triple-negatieve borsttumoren, te onderzoeken

In Hoofdstuk 4 wordt het potentieel van “photocaging” met ruimte voor één enkele remmer beschreven, terwijl Hoofdstuk 3 zich richt op de studie van de rutheniumcomplexen  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{bapbpy})(\text{X})(\text{Y})]^{2+}$ , welke beschikken over twee axiale coördinatiesites. Hoofdstuk 5 brengt deze concepten samen door zowel de coördinatie van twee identieke als verschillende remmers aan het  $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{bapbpy})(\text{X})(\text{Y})]^{2+}$  platform te onderzoeken. Synthetische letaliteit, die gebruikmaakt van genetische mutaties in tumoren, wordt al met succes toegepast bij de behandeling van kankercellen met BRCA-mutaties, gebruikmakend van PARP-remmers. Deze benadering vereist echter het specifiek identificeren van genetische mutaties binnen tumoren, om gezonde cellen te sparen, wat een uitgebreid en tijdrovend proces is. Ondanks deze uitdagingen heeft synthetische letaliteit zijn effectiviteit bewezen: de inactivatie van twee genen kan leiden tot verhoogde cytotoxiciteit in kankercellen. Om dit te bewerkstelligen zonder afhankelijk te zijn van mutatie is een reeks verbindingen onderzocht met een enkele RAD51-remmer (X=B0Cl) gecombineerd met een andere remmer (Y), zoals STF31 voor NAMPT-inhibitie of PIK75 voor de remming van DNA-PK. Als controle werden ook twee identieke RAD51-remmers, B0Cl of B02, aan één rutheniumcentrum gecoördineerd (X=Y). Alle verbindingen toonden vergelijkbare blauwlicht-geïnduceerde

fotosubstitutie-opbrengsten, ongeveer 0,06 voor de eerste substitutie en ongeveer 0,003 voor de tweede. De succesvolle activatie van deze verbindingen toont aan dat twee verschillende inhibitoren succesvol gecaged kunnen worden, waarna ze door lichtactivatie vrijgegeven kunnen worden. Dit biedt de mogelijkheid om twee inhibitoren, die samen een bewezen synergetisch effect hebben, in te zetten voor nieuwe en selectieve kankerbehandelingen gebaseerd op synthetische letaliteit, zonder dat een specifieke mutatie in de kankercellen vereist is.