UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA

Metalofármacos inteligentes como agentes teranósticos para a terapia de precisão do cancro da mama

Bárbara de Sousa Marques

Mestrado em Química
Especialização em Química

Versão Pública

Dissertação orientada por:
Doutora Tânia Morais

2024

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora Doutora Tânia Morais. Obrigada pela confiança depositada em mim para a realização deste trabalho. Agradeço os ensinamentos, a disponibilidade, a paciência, a boa disposição e o apoio incessante durante as etapas mais difíceis deste último ano. Espero poder continuar a aprender e a partilhar da sua companhia em trabalho futuro.

Agradeço também à Professora Doutora Helena Garcia por me ter acolhido novamente no seu grupo de investigação.

Gostaria de agradecer a todos os membros do grupo de Química (Bio)Organometálica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, e a todas as pessoas que passaram pelo laboratório e fizeram parte deste meu ano de trabalho. Agradeço especialmente ao Marco, companheiro de todos os dias, pelos momentos de aprendizagem, mas também de descontração. Agradeço também ao Ricardo e à Catarina, que tornaram o laboratório num lugar mais acolhedor para crescer e aprender.

Agradeço ao Professor Doutor José Manuel Nogueira e à Professora Doutora Paula Robalo pela disponibilização dos sistemas de RP-HPLC utilizados na realização deste trabalho. Agradeço também ao Doutor João António pelas análises de ESI-MS.

Aos meus amigos desde (quase) sempre, agradeço a companhia ao longo deste percurso, mesmo que de longe.

Obrigada à Beatriz pela amizade, pelos momentos de conversa e riso, pela companhia durante todo o meu percurso académico, e por estar sempre disponível para um lanchinho. Agradeço também à Bruna e à Ana, amigas que me deram força para continuar.

Agradeço em especial ao David, cuja motivação e carinho fizeram com que tudo parecesse mais fácil.

Agradeço profundamente à minha Mãe, sem ela não estaria onde estou hoje. Obrigada pela motivação quando estou mais em baixo, pela alegria e orgulho quando atinjo os meus objetivos, e pela confiança e amor incondicionais.

O trabalho experimental apresentado nesta tese foi realizado no grupo de Química (Bio)Organometálica do Centro de Química Estrutural (CQE) da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL), sob a orientação da Doutora Tânia Morais.

Este trabalho recebeu o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e Tecnologia através do projeto "Fármacos de ruténio-péptido: flechas para alvejar seletivamente o cancro da mama" (PTDC/QUI-QIN/0146/2020, DOI 10.54499/PTDC/QUI-QIN/0146/2020) e encontra-se protegido pelo pedido internacional de patente WO 2023/199134.

Resumo

O cancro da mama metastático ocorre em 20-50% dos casos de cancro da mama, e apresenta mortalidade muito elevada. O seu diagnóstico precoce e a localização precisa das metástases são cruciais para aumentar a probabilidade de sucesso do tratamento. Assim, os agentes teranósticos, que combinam terapia e diagnóstico num único sistema, têm surgido como uma abordagem promissora para a terapia guiada deste tipo de cancro, especialmente se conjugados a vetores de entrega que aumentam a sua seletividade.

O grupo da Doutora Tânia Morais tem vindo a desenvolver sistemas inteligentes de entrega de fármacos inovadores, pela conjugação de uma unidade citotóxica de Ru a um péptido seletivo para as células cancerosas através de um *linker* sensível a um estímulo do microambiente tumoral. Estes conjugados ruténio-péptido (RuPCs) permitem a libertação da espécie ativa apenas no local do tumor, evitando efeitos secundários indesejados. De forma a aumentar a eficácia terapêutica destes sistemas, pretendeu-se neste trabalho conferir características teranósticas aos RuPCs, através da conjugação de uma sonda de fluorescência ao péptido.

No decorrer deste trabalho, foram sintetizados quatro complexos de RuCp (três deles novos), e a sua caracterização completa por espetroscopias de NMR (^{1}H, ^{13}C, ^{31}P, ^{19}F e bidimensionais), FTIR e UV-Vis permitiu a confirmação das estruturas propostas. Após a avaliação da estabilidade e lipofilia dos novos complexos de Ru, o complexo 1 mostrou-se o mais promissor para ser usado nos novos RuPCs. Também o complexo 4 foi selecionado como agente citotóxico para formar novos RuPCs teranósticos, devido às suas propriedades físico-quimicas e biológicas promissoras (obtidas previamente a este trabalho).

Foram sintetizados três péptidos, dois deles novos, com recurso ao método de US-SPPS, e foram funcionalizados para permitir a conjugação aos complexos de RuCp. Foi ainda adicionada uma sonda de fluorescência do tipo cumarina aos dois péptidos novos, para lhes conferir propriedades de diagnóstico. A purificação e caracterização de todos os péptidos foi feita com recurso a RP-HPLC e ESI-MS.

Foram ainda sintetizados com sucesso dois RuPCs, que foram purificados e caracterizados com recurso a RP-HPLC e ESI-MS. Foi avaliada a capacidade de o conjugado RuPC1 libertar de forma controlada a unidade citotóxica de Ru por RP-HPLC, durante 48 h, a valores de pH 6.8 e 7.4 que mimetizam o microambiente tumoral e tecidos saudáveis, respetivamente, tendo-se concluído que o perfil de libertação deste RuPC não é adequado para a aplicação desejada.

Apesar de ainda não ter sido desenvolvido um RuPC teranóstico, o trabalho realizado no âmbito desta dissertação constitui fortes progressos para o alcance deste objetivo.

Palavras-chave:

Cancro da mama metastático

Agentes Teranósticos

Complexos de RuCp

Sistemas inteligentes de entrega de fármacos

Conjugados ruténio-péptido

Abstract

Metastatic breast cancer occurs in 20-50% of breast cancer cases and and presents a very high mortality rate. Early diagnosis and precise localization of metastases are fundamental to increasing the chances of successful treatment. Theranostic agents, which combine therapy and diagnosis in a single system, have emerged as a promising approach for guided therapy in this type of cancer, especially when combined with drug delivery moieties that enhance their selectivity.

Doctor Tânia Morais' group has been developing innovative smart drug delivery systems by conjugating a cytotoxic Ru unit to a peptide selective for cancer cells through a linker sensitive to a tumor microenvironment stimulus. These ruthenium-peptide conjugates (RuPCs) allow the release of the active species only at the tumor site, avoiding undesirable side effects. To enhance the therapeutic efficacy of these systems, this work aimed to develop new RuPCs with theranostic properties by attaching a fluorescent probe to the peptide.

During this project, four RuCp complexes (three of them new) were synthesized, and their complete characterization by NMR spectroscopy (^{1}H, ^{13}C, ^{31}P, ^{19}F, and 2D experiments), FTIR, and UV-Vis confirmed the proposed structures. After evaluating the stability and lipophilicity of the new Ru complexes, complex 1 was identified as the most promising for use in new RuPCs. Complex 4 was also selected as a cytotoxic agent to form new theranostic RuPCs, due to its promising physicochemical and biological properties (obtained prior to this work).

Three peptides, two of them new, were synthesized using the US-SPPS method, and were appropriately functionalized to allow conjugation to the Ru complexes. A coumarin-type fluorescent probe was added to the two new peptides, to furnish them with diagnostic properties. All of the peptides were purified and fully characterized by RP-HPLC and ESI-MS.

Two RuPCs were also successfully synthesized, and were purified and characterized using RP-HPLC and ESI-MS. The ability of RuPC1 to release the cytotoxic Ru unit in a controlled manner at pH values of 6.8 and 7.4, which mimic the tumor microenvironment and healthy tissues respectively, was evaluated by RP-HPLC over 48 hours. It was concluded that the release profile of this RuPC is not suitable for the desired application.

Although a theranostic RuPC has not yet been developed, the work carried out in this dissertation represents significant progress towards achieving this goal.

Keywords:

Metastatic breast cancer

Theranostic agents

RuCp complexes

Smart drug-delivery systems

Ruthenium-peptide conjugates

Índice Geral

Agradecimentos ..... **iii**

Resumo ..... **vii**

Abstract ..... **viii**

Índice Geral ..... **ix**

Índice de figuras ..... **xi**

Índice de tabelas ..... **xv**

Índice de compostos ..... **xvi**

Lista de abreviaturas e símbolos ..... **xix**

Lista de aminoácidos naturais ..... **xxiii**

1 . Introdução **1**

1.1. Cancro 1

1.2. Terapia do cancro 2

1.3. Péptidos como vetores de entrega de fármacos 6

1.4. Conjugados ruténio-péptido 6

1.5. Agentes teranósticos contra o cancro 8

1.6. Enquadramento do presente trabalho 10

2 . Síntese e caracterização de novos complexos de ruténio **12**

2.1. Síntese de novos complexos de ruténio 12

2.2. Caracterização de novos complexos de ruténio 13

2.3. Avaliação da estabilidade em solução dos novos complexos de ruténio 18

2.4. Determinação do coeficiente de partição em octanol/água ($logP_{o/a}$) 22

3 . Síntese e caracterização de novos conjugados ruténio-péptido (RuPCs) **24**

3.1. Síntese e caracterização de péptidos 24

3.2. Síntese e caracterização de novos RuPCs 27

3.3. Sínteses inconclusivas 29

3.4. Ensaios de libertação do complexo ativo de Ru (4) a partir do RuPC1 a diferentes valores de pH 30

4 . Conclusões e perspetivas futuras **33**

5 . Descrição experimental **36**

5.1. Procedimentos gerais 36

5.2. Técnicas de caraterização estrutural 36

5.3. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) analítica 37

5.4. Espetrometria de massa com ionização por *eletrospray* (ESI-MS) 38

5.5. Síntese de complexos de Ru(II) 38

5.6. Síntese de péptidos 42
5.7. Síntese dos conjugados ruténio-péptido (RuPCs) 47
5.8. Sínteses inconclusivas 48
5.9. Estudos de estabilidade dos complexos organometálicos em solução 51
5.10. Determinação do coeficiente de partição em octanol/água ($logP_{o/a}$) 52
5.11. Ensaios de libertação do complexo ativo de Ru a partir do RuPC1 a diferentes valores de pH 52
Referências 54
Anexo 63
Anexo A. Espetroscopia de NMR 63
Anexo B. Espetroscopia de UV-Visível 75
Anexo C. Espetroscopia de FTIR 76
Anexo D. Cromatogramas de RP-HPLC 78
Anexo E. Espetrometria de ESI-MS 80
Anexo F. Curvas de calibração para determinação do $logP_{o/a}$ 81