

DISS. ETH NO. 29283

# **The Efficacy and Fate of Radio-Enhancing Metal Organic Frameworks**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Anna Lena Neuer

MSc, University of Constance

26.02.1992

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Inge Herrmann

Prof. Dr. Martin Pruschy

2023

# Summary

Nanomaterials have gained increasing attention in biomedical research due to their exclusive physical, chemical and biological properties. Due to their size, which matches the scale of disease processes and allows intimate interaction with cells and their constituents, nanomaterials find potential biomedical applications in drug delivery, imaging, tissue engineering, biosensing, cancer therapy as well as theranostics (i.e. the combination of diagnosis and therapy).

Initially, nanobiotechnology research has focused predominantly on metal and metal oxide nanoparticles, besides the widely researched class of organic nanomaterials including liposomes and micelles. However, the community's ability to design and synthesize increasingly sophisticated nanomaterials has shifted the focus to new material classes, including metal organic frameworks (MOFs). MOFs are a class of porous materials consisting of metal clusters linked by organic linker molecules. MOF structures are especially interesting due to their high freedom in materials design and tunable physicochemical characteristics, translating into promising therapeutic and diagnostic properties. The tailorability of the MOF activity also offers a new route to combination therapies, such as chemo-radiotherapy.

Despite the excitement by the research community based on the new fascinating opportunities offered by these materials, translation of new (nanomedical) materials from the lab into clinics is complex and slow. The translational process is, amongst other factors, hampered by the well-known disconnect between animal models and human (patho)physiology, and missing physiologically relevant high throughput platforms for rational, data-driven material candidate selection. In addition to maximal performance, in-depth knowledge on biocompatibility and safety over the entire course of application is an indispensable part of sustainable materials development. Especially MOFs are known to exhibit a lower chemical stability in comparison to their metal oxide counter partners, and therefore the introduction of more "exotic", non-essential elements and ions *in vivo* has to be understood in detail, before such materials can be considered for medical use. Thus, an in-depth understanding of the MOF's chemical stability and fate is imperative for successful and sustainable clinical translation.

This thesis aims to present approaches to narrow the gap between material design and clinical translation based on high throughput platforms for the concurrent assessment of nanomaterial

performance as well safety. A focus is put on (bio)chemical environment dependent (bio-)transformation processes of novel candidate nanomaterials, alongside an analytical strategy enabling the reliable assessment and characterization of the material fate in its entirety.

Chapter 1 summarizes the state of the art and recent advances in the field of bio-chemical transformations of biomedically relevant inorganic nanomaterials, including metals, metal-oxides and metal organic frameworks in physiological environments. The application route strongly defines the environment encountered by the nanomaterial, and strongly affects the fate of the nanomaterial. Besides the description and classification of chemical environment-dependent transformations, this chapter also provides an overview of potential model systems and their suitability for the study of nanomaterial fate. The choice of model strongly depends on the research focus and the appropriate choice of analytical techniques is imperative for the investigation of underlying reaction mechanisms. Taken together, this chapter aims to provide a summary of reaction mechanisms and model systems relevant for nanomaterials in biomedical systems, and seeks to provide a framework for the prediction of material transformations with potential implications for nanomaterial efficacy and biocompatibility.

Chapter 2 introduces the therapeutic application of metal-based nanomaterials for radio-enhancement purposes. The physical, chemical and biological responses to ionizing radiation leading to an enhanced biological effect in form of increased cell damage and cell death are discussed. Furthermore, most widely researched radio-enhancer candidate materials (incl. materials based on high atomic number ( $Z$ ) elements Au, Gd and Hf) are introduced with a focus on the most recent research developments in the field as well as clinical advances.

Chapter 3 presents a set of four group IV metal organic frameworks (MOFs) as promising radio-enhancer candidate materials, offering an alternative to conventional metal oxides. Following a comprehensive physicochemical characterization of the MOFs, data on the radio-enhancing potential of Hf-, Ti-, and Ti/Zr-based MOFs in cell free conditions as well as *in vitro* cell cultures is presented in direct equimolar comparison to the corresponding metal oxides. Surprisingly, the radio-enhancing potential of the Ti- and TiZr-based MOFs outperformed the higher- $Z$  Hf-based materials as well as the respective metal oxides with dose modifying ratios (DMR) of 3.83 for Ti-MIL and 2.20 for TiZr-PCN in human sarcoma cells compared to 1.36 and 1.37 for Hf-DBA and Hf-TCPP, respectively. These results indicate that lower- $Z$  materials, such as Ti-based nanoparticles, may offer a promising route to X-ray radio-enhancement due to their catalytic activity instead of the conventionally investigated high- $Z$  materials exploiting the photoelectric effect.

In chapter 4, the radio-enhancing potential of gold nanoparticles, which remain the current gold standard material for X-ray radio-enhancement, is demonstrated in 3D HeLa cell microtissues. An advanced co-cultured 3D tumor microtissue model was developed for the direct assessment of the performance of differently sized gold nanoparticles (5 and 50 nm) in 2D and 3D *in vitro* settings. As the limited tissue penetration of larger particles reduced their effectivity in 3D settings, a nanoparticle application prior to tissue formation was established for a reliable assessment of radio-enhancing efficacy as a function of size, uptake and intracellular distribution in non-vascularized 3D microtissues. The tissue like feature exhibited by the 3D microtissues (higher tolerance towards nanoparticles and radiation) are distinct from the conventional 2D cell culture and may provide a valuable intermediate platform for the efficient pre-selection of radio-enhancer candidate materials.

In chapter 5, I present a co-cultured tumor microtissue model containing human sarcoma cells alongside human fibroblasts. To overcome the disconnect between *in vitro* and *in vivo* findings and accelerate candidate material selection, this co-cultured tumor model was developed to enable a fast paced concurrent assessment of radio-enhancement performance and healthy cell toxicity in a single step. The radio-enhancing potential of group IV MOFs was exemplarily shown and benchmarked against gold nanoparticles. Dose enhancement factors were generally lower compared to the conventional 2D cell cultures with values between 1.4 and 1.8 for Hf-, Ti-, TiZr- and Au-based materials. A significant reduction of dose enhancement effects compared to 2D settings was observed especially in the Ti-based materials, suggesting that the oxygen diffusion limitation is hampering the catalytic activity of the MOF.

Chapter 6 presents an analytical strategy for the comprehensive characterization of the biomedical fate of novel nanomaterials. A systematic approach to assess (bio)transformation processes of nanomaterials is presented and exemplified based on a selection of MOF candidate materials. The MOF portfolio includes MOFs for radio-enhancement applications (Hf-DBA, Ti-MIL, and TiZr-PCN) alongside two popular MOFs employed for drug delivery applications (Zn-ZIF and Zn-ZIF:Ce). Based on a combination of cell-free media and short- and long-term cell culture studies, the gradual increase in complexity of the system enables systematic insights into the nanomaterial fate as a function of (bio)chemical environment. Such investigations reveal transformation of all MOFs in cell free lysosomal conditions (pH 4.5) with full dissolution of Ti-MIL, Zn-ZIF and Zn-ZIF:Ce and partial dissolution for Hf-DBA and TiZr-PCN. Exposure to phosphate rich buffers leads to incorporation of phosphorous into the solid structure and in some cases also to amorphization. Zn-ZIF fully transforms into zinc-phosphate, while for Ti-MIL, a pH dependent phosphate incorporation was found leading to compartment-specific transformation in long-term cell culture experiments. This data encourages a considerate choice of suspension buffer for MOFs and supports

the cautious investigation of nanomaterial state at all stages of their life cycle, as significant material property alterations may occur along the way.

Finally, chapter 7 provides an overview of the key scientific findings of this thesis including the contributions to the field of nanomaterial research for biomedical applications along with promising future research priorities.

Taken together, this thesis not only presents promising MOF candidate materials for X-ray radio-enhancement along with a detailed assessment of efficacy, safety and fate in advanced *in vitro* models but also an in-depth analytical strategy enabling the assessment of key (bio)transformation processes in physiological conditions, ensuring efficacy and safety over the entire life cycle. Based on the here presented data, conclusions on therapeutic performance as well as environment-dependent transformations can be drawn thus facilitating the safe and sustainable design and development of new materials for biomedical use.

# Zusammenfassung

Nanomaterialien haben in der biomedizinischen Forschung aufgrund ihrer exklusiven physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften zunehmend an Bedeutung gewonnen. Aufgrund ihrer Größe, die der Größenordnung von Krankheitsprozessen entspricht und eine enge Wechselwirkung mit Zellen und ihren Bestandteilen ermöglicht, finden Nanomaterialien potenzielle biomedizinische Anwendungen in den Bereichen Arzneimittelverabreichung, Bildgebung, Tissue Engineering, Biosensorik, Krebstherapie und Theranostik (d. h. die Kombination von Diagnose und Therapie).

Ursprünglich konzentrierte sich die Forschung im Bereich der Nanobiotechnologie vor allem auf Metall- und Metalloxid-Nanopartikel, neben den weithin erforschten organischen Nanomaterialien einschließlich Liposomen und Mizellen. Die Fähigkeit der Wissenschaftlichengemeinschaft, immer ausgefeiltere Nanomaterialien zu entwerfen und zu synthetisieren, hat den Schwerpunkt jedoch auf neue Materialklassen verlagert, darunter metallorganische Gerüstverbindungen (metal organic frameworks, MOFs). MOFs sind eine Klasse poröser Materialien, die aus Metallclustern bestehen, die durch organische Linkermoleküle verbunden sind. MOF-Strukturen sind aufgrund ihrer großen Freiheit beim Materialdesign und ihren vielseitigen physiochemischen Eigenschaften besonders interessant, was sich in vielversprechenden therapeutischen und diagnostischen Eigenschaften niederschlägt. Die Anpassungsfähigkeit der MOF-Aktivität bietet auch einen neuen Möglichkeiten für Kombinationstherapien, wie z. B. die Chemo-Strahlentherapie.

Trotz der Begeisterung der Forschungsgemeinschaft über die neuen faszinierenden Möglichkeiten, die diese Materialien bieten, ist die Umsetzung neuer (nanomedizinischer) Materialien vom Labor in die Klinik kompliziert und langsam. Der Umsetzungsprozess wird unter anderem durch die bekannte Diskrepanz zwischen Tiermodellen und menschlicher (Patho-)Physiologie und das Fehlen physiologisch relevanter Hochdurchsatzplattformen für eine rationale, datengesteuerte Auswahl von Materialkandidaten behindert. Neben der maximalen Leistung ist ein fundiertes Wissen über Biokompatibilität und Sicherheit während des gesamten Anwendungsprozesses ein unverzichtbarer Bestandteil der nachhaltigen Materialentwicklung. Insbesondere MOFs sind dafür bekannt, dass sie im Vergleich zu ihren Metalloxid-Gegenspielern eine geringere chemische Stabilität aufweisen. Daher muss die Einführung von "exotischeren", nicht essentiellen Elementen und Ionen *in vivo* im

Detail verstanden werden, bevor solche Materialien für den medizinischen Einsatz in Betracht gezogen werden können. Daher ist ein tiefgreifendes Verständnis der chemischen Stabilität und des Verbleibs der MOFs für eine erfolgreiche und nachhaltige klinische Anwendung unerlässlich.

In dieser Arbeit werden Ansätze vorgestellt, um die Lücke zwischen Materialdesign und klinischer Anwendung zu schließen, und zwar auf der Grundlage von Hochdurchsatzplattformen zur gleichzeitigen Bewertung der Leistung und Sicherheit von Nanomaterialien. Der Schwerpunkt liegt dabei auf (bio)chemischen Umfeld abhängigen (Bio-)Transformationsprozessen neuartiger Nanomaterialien und einer analytischen Strategie, die eine zuverlässige Bewertung und Charakterisierung des gesamten Materialverhaltens ermöglicht.

Kapitel 1 fasst den Stand der Technik und die jüngsten Fortschritte auf dem Gebiet der biochemischen Umwandlung von biomedizinisch relevanten anorganischen Nanomaterialien, einschließlich Metallen, Metalloxiden und metallorganischen Gerüsten in physiologischer Umgebung, zusammen. Der Applikationsweg bestimmt in hohem Maße die Umgebung, die das Nanomaterial antritt, und hat einen großen Einfluss auf den Verbleib des Nanomaterials. Neben der Beschreibung und Klassifizierung chemischer umweltabhängiger Umwandlungen bietet dieses Kapitel auch einen Überblick über potenzielle Modellsysteme und ihre Eignung für die Untersuchung des Verbleibs von Nanomaterialien. Die Wahl des Modells hängt stark vom Forschungsschwerpunkt ab, und die geeignete Wahl der Analysetechniken ist für die Untersuchung der zugrundeliegenden Reaktionsmechanismen unerlässlich. Insgesamt soll dieses Kapitel einen Überblick über Reaktionsmechanismen und Modellsysteme geben, die für Nanomaterialien in biomedizinischen Systemen relevant sind, und einen Rahmen für die Vorhersage von Materialveränderungen mit möglichen Auswirkungen auf die Wirksamkeit und Biokompatibilität von Nanomaterialien bieten.

In Kapitel 2 wird die therapeutische Anwendung von Nanomaterialien auf Metallbasis für Zwecke der Strahlenverstärkung vorgestellt. Die physikalischen, chemischen und biologischen Reaktionen auf ionisierende Strahlung, die zu einer verstärkten biologischen Wirkung in Form von erhöhter Zellschädigung und Zelltod führen, werden diskutiert. Darüber hinaus werden die am meisten erforschten Kandidaten für Strahlenverstärkung (einschließlich Materialien auf der Basis der Elemente mit hoher Ordnungszahl (Z) Au, Gd und Hf) vorgestellt, wobei der Schwerpunkt auf den jüngsten Forschungsentwicklungen auf diesem Gebiet sowie auf klinischen Fortschritten liegt.

In Kapitel 3 werden vier metallorganische Gerüste der Gruppe IV als vielversprechende Kandidaten als Strahlen-Verstärker vorgestellt, die eine Alternative zu herkömmlichen Metalloxiden darstellen. Nach einer umfassenden physikochemischen Charakterisierung der MOFs werden Daten über das strahlenverstärkende Potenzial von Hf-, Ti- und Ti/Zr-basierten MOFs unter zellfreien

Bedingungen sowie in *In vitro* Zellkulturen im direkten äquimolaren Vergleich mit den entsprechenden Metalloxiden vorgestellt. Überraschenderweise übertraf das strahlenverstärkende Potenzial der Ti- und TiZr-basierten MOFs die höhere-Z Hf-basierten MOFS sowie die entsprechenden Metalloxide mit dosisverändernden Verhältnissen (dose modifying ratios DMR) von 3,83 für Ti-MIL und 2,20 für TiZr-PCN in menschlichen Sarkomzellen im Vergleich zu 1,36 und 1,37 für Hf-DBA und Hf-TCPP. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Materialien mit niedrigeren Z-Werten, wie z. B. Nanopartikel auf Ti-Basis, aufgrund ihrer katalytischen Aktivität einen vielversprechenden Weg zum Röntgenstrahlen-Verstärkung bieten könnten, im Gegensatz zu den herkömmlich untersuchten Materialien mit hohen Z-Werten, die den photoelektrischen Effekt nutzen.

In Kapitel 4 wird das strahlenverstärkende Potenzial von Goldnanopartikeln, die nach wie vor das derzeitige Standardmaterial für die Strahlenverstärkung sind, in 3D-Mikrogewebe aus HeLa-Zellen gezeigt. Ein fortschrittliches kokultiviertes 3D-Tumor-Mikrogewebe-Modell wurde für die direkte Bewertung der Leistung von Gold-Nanopartikeln unterschiedlicher Größe (5 und 50 nm) in 2D- und 3D- *In vitro* Modellen entwickelt. Da die begrenzte Gewebepenetration größerer Partikel ihre Wirksamkeit in 3D-Modellen einschränkt, wurde eine Nanopartikel-Applikation vor der Gewebebildung für eine zuverlässige Bewertung der strahlenverstärkenden Wirksamkeit als Funktion der Größe, der Aufnahme und der intrazellulären Verteilung in nicht vaskularisierten 3D-Mikrogeweben etabliert. Die gewebeähnlichen Eigenschaften der 3D-Mikrogewebe (höhere Toleranz gegenüber Nanopartikeln und Strahlung) unterscheiden sich von der konventionellen 2D-Zellkultur und können eine wertvolle Zwischenplattform für die effiziente Vorauswahl von radioaktiven Wirkstoffen darstellen.

In Kapitel 5 stelle ich ein kokultiviertes Tumor-Mikrogewebemodell vor, das neben menschlichen Sarkomzellen auch menschliche Fibroblasten enthält. Um die Diskrepanz zwischen *In vitro*- und *In vivo*-Ergebnissen zu überwinden und die Auswahl von Materialkandidaten zu beschleunigen, wurde dieses kokultivierte Tumormodell entwickelt, um in einem einzigen Schritt eine schnelle und gleichzeitige Bewertung der Strahlenverstärkenden-Leistung und der Toxizität gesunder Zellen zu ermöglichen. Das Strahlenverstärkende-Potenzial von MOFs der Gruppe IV wurde exemplarisch gezeigt und mit Gold-Nanopartikeln verglichen. Die Dosisverstärkungsfaktoren waren im Allgemeinen niedriger als bei herkömmlichen 2D-Zellkulturen, mit Werten zwischen 1,4 und 1,8 für Hf-, Ti-, TiZr- und Au-basierte Materialien. Eine signifikante Verringerung der Dosisverstärkungseffekte im Vergleich zu 2D-Einstellungen wurde vor allem bei den Ti-basierten Materialien beobachtet, was darauf hindeutet, dass die Sauerstoffdiffusionsbeschränkung die katalytische Aktivität der MOFs behindert.



In Kapitel 6 wird eine analytische Strategie für die umfassende Charakterisierung für biomedizinische Veränderungen neuartiger Nanomaterialien vorgestellt. Es wird ein systematischer Ansatz zur Bewertung von (Bio-)Transformationsprozessen von Nanomaterialien vorgestellt und anhand einer Auswahl von MOF-Kandidatenmaterialien veranschaulicht. Das MOF-Portfolio umfasst MOFs zur Strahlenverstärkung (Hf-DBA, Ti-MIL und TiZr-PCN) sowie zwei populäre MOFs, die als Transportmittel für Medikamenten eingesetzt werden (Zn-ZIF und Zn-ZIF:Ce). Auf der Grundlage einer Kombination aus zellfreien Medien und Kurz- und Langzeitstudien an Zellkulturen ermöglicht die schrittweise Erhöhung der Komplexität des Systems systematische Einblicke in die Veränderung der Nanomaterialien in Abhängigkeit von der (bio)chemischen Umgebung. Diese Untersuchungen zeigen die Umwandlung aller MOFs unter zellfreien lysosomalen Bedingungen (pH 4,5) mit vollständiger Auflösung von Ti-MIL, Zn-ZIF und Zn-ZIF:Ce und teilweiser Auflösung von Hf-DBA und TiZr-PCN. Die Exposition gegenüber phosphatreichen Puffern führt zum Einbau von Phosphor in die feste Struktur und in einigen Fällen auch zur Amorphisierung. Zn-ZIF verwandelt sich vollständig in Zinkphosphat, während bei Ti-MIL ein pH-abhängiger Phosphateinbau festgestellt wurde, der in Langzeit-Zellkulturexperimenten zu einer kompartmentspezifischen Umwandlung führt. Diese Ergebnisse ermutigen zu einer wohlüberlegten Wahl des Suspensionspuffers für MOFs und unterstützen die bedachte Untersuchung des Zustands von Nanomaterialien in allen Applikations Phasen, da sich die Materialeigenschaften erheblich verändern können.

Schließlich gibt Kapitel 7 einen Überblick über die wichtigsten wissenschaftlichen Ergebnisse dieser Arbeit, einschließlich der Beiträge zur Nanomaterialforschung für biomedizinische Anwendungen sowie vielversprechender zukünftiger Forschungsprioritäten.

Insgesamt werden in dieser Arbeit nicht nur vielversprechende MOF-Kandidaten für die Strahlenvertärkung zusammen mit einer detaillierten Bewertung der Wirksamkeit, Sicherheit und des Verbleibs in fortgeschrittenen *In vitro*-Modellen vorgestellt, sondern auch eine eingehende Analysestrategie, die die Bewertung wichtiger (Bio-)Transformationsprozesse unter physiologischen Bedingungen ermöglicht und die Wirksamkeit und Sicherheit über den gesamten Lebenszyklus hinweg gewährleistet. Auf der Grundlage der hier vorgestellten Daten können Schlussfolgerungen zur therapeutischen Leistung sowie zu Umgebungsabhängigen Umwandlungen gezogen werden, was die sichere und nachhaltige Gestaltung und Entwicklung neuer Materialien für biomedizinische Anwendungen erleichtert.