

Projektszám: <b>88öu4</b>		<b>HUF 746.000</b> <b>EUR 1.140</b>
Pályázó neve: <b>Dr. Enyedy Éva Anna</b>	Intézménye: <b>Szegedi Tudományegyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék</b>	
Projektpartner neve: <b>Dr. Christian Kowol</b>	Intézménye: <b>Bécsi Egyetem, Szervetlen Kémiai Intézet</b>	
Pályázat címe: <b>Novel anticancer thiosemicarbazone compounds: development and characterization</b>		

**A projekt jellege: (kérjük bejelölni)**

- Workshop, konferencia
- Publikáció, tananyag
- **Kutatási együttműködés**
- Oktatási program

**Beszámoló/Eredmények**

A projekt fő célja új rákellenes tioszemikarbazon vegyületek előállításának, oldategyensúlyi viselkedésük és biológiai aktivitásuk jellemzése volt. Az antitumor hatás növelése mellett törekedtünk az új ligandumok vas(II/III)ionokkal történő komplexképzésének jellemzésére, melynek a hatásmechanizmusban van szerepe a ribonukleotid redukáz inhibícióján keresztül; valamint jellemeztük és elemeztük az újonnan előállított tioszemikarbazon réz(II) és vanádium(IV/V)) komplexek vizes oldatbeli stabilitásának és biológiai hatásának kapcsolatát. A réz(II)komplexek redoxi tulajdonságait is összehasonlítottuk: redukálhatóságukat közvetlenül mértük fiziológias redukálószerekkel. A Triapine nagyon gyorsan kiürül a szervezetből, ezért úgy módosítottuk, hogy alkalmas legyen a humán szérumban albuminhoz specifikusan kötődni, melynek révén hosszabb időt tölthet a véráramban és nagyobb eséllyel juthat el a célsejtekig. A származékképzés ugyan sikeres volt, de az N-terminális véghez kapcsolt oktiloxi-fenil szubsztituens, mely biztosította volna a fehérjéhez való kötődést, a Triapine oldhatóságát annyira lecsökkentette, hogy vizes oldatban a kísérleti módszereinket nem tudtuk használni (pl. fluorimetria, ultraszűrés, NMR). Ez indokolta, hogy a közös munkát egy ígéretesebb területen folytattuk. A bécsi kutatócsoportban egy olyan új kobalt(III)komplexet állítottak elő, melynek liganduma hatásos tirozin-kináz (EGFR) inhibitor, de csak a rákos szövetekre jellemző hipoxiás, azaz redukáló környezetben aktiválódik. A ligandum a redukció révén képződő kobalt(II)komplex megnövekedő stabilitása és instabilitása miatti disszociációjával válik szabaddá [C. Karnthaler-Benbakka, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 53, 1-7]. A projekt keretein belül ennek a kobalt(III)komplexnek és másik három törzskönyvezett tirozin-kináz inhibitor molekulának a humán szérumban való kölcsönhatását jellemeztük és hasonlítottuk össze.

A projekt keretén belül a két kutatócsoport közös munkája számos új eredményt eredményezett, bár jelentős részének a közlésre való előkészítése jelenleg is folyik. Eddig egy cikk jelent meg a projekthez kapcsolódóan, és másik három van beküldött/közlésre előkészített állapotban. Emellett 2 nemzetközi, 1 magyarországi konferencián mutattuk be a közös eredményeket, valamint egy szakdolgozat is készült. A kapott eredményeket öt nagy csoportba soroljuk: i) vanádium(IV/V)komplexek  $\alpha$ -N-pyridil és szalicilaldehid tioszemikarbazonokkal; ii) O/Se és 3-N-metilezett Triapine származékok komplexképzése vas(II/III) és réz(II)ionokkal; iii) piridoxáltioszemikarbazonok komplexképzése vanádium és rézionokkal; iv) a Triapine NH<sub>2</sub> csoportjainak metilezésének hatása a biológiai aktivitásra; v) tirozin-kináz inhibitorok kölcsönhatása humán szérumban albuminnal.

i) A Triapine és két terminális aminocsoporton dimetilezett származékának vanádium(IV/V)ionokkal képzett komplexeinek összetételét és vizes oldatbeli stabilitását határoztuk meg pH-potenciometriás, ESR és <sup>51</sup>V NMR spektroszkópiai módszerekkel. A dimetilezés egyértelműen növelte a komplexek stabilitását. Három komplexet szilárd fázisban is előállítottunk. Az *in vitro* citotoxicitás mérések azonban azt mutatták, hogy a fémionok koordinációja nem növelte meg a ligandumok saját aktivitását. Emiatt vontuk be a

vizsgálatba a szalicilaldehid tioszemikarbazont, melyben a piridil-N helyett fenolos-OH csoport képes koordinálódni ((N,N,S<sup>-</sup>) vs. (O,N,S<sup>-</sup>)). Ez a donatoratom-csere egyértelműen növelte a vanádiumkomplexek vizes oldatbeli stabilitását és a vanádium(V) esetén a komplex a ligandumtól aktívabbnak bizonyult. [MS-1]

ii) A Triapine alpmolekulában a kén oxigénre ill. szélénre történő cseréje döntően befolyásolja a ligandum fémkötő sajátságát. Az (N,N,O-) koordinációs mód kisebb, míg a (N,N,Se-) kötésmód nagyobb stabilitású réz(II)komplexeket eredményez az (N,N,S<sup>-</sup>) módhoz képest. A 3-N-metilézés is megnövekedett stabilitást hozott meglepő módon, pedig ez a ligandum nem képes az anionos koordinációs módra. Alapvető különbség volt ezen származékok réz(II)komplexeinek összetételében is, mert az oxo-, szeleno- és 3-N-metil-Triapine kizárólag mono-ligandumú komplexeket képez szemben a Triapinnal, mely bisz-ligandumú és dimer komplexeket is képez. Nagy különbség volt ezen ligandumok réz(II)komplexeinek oxidáló képességében is. A glutation mind a 4 ligandum réz(II)komplexét képes redukálni, de a Triapine és a szeleno-Triapine esetében a reakció lényegesen lassabb; míg az aszkorbinsav, mely egy gyengébb redukálószer, csak az oxo-Triapine komplexét tudja redukálni. Ezen különbségek is szerepet játszhatnak a biológiai aktivitásban. A vizsgált ligandumok vas(II/III)ionokkal való kölcsönhatásukban is nagy különbséget mutatnak. Pl. az oxo-Triapine vas(II)ionok felé mutatott affinitása igen alacsony, melynek szerepe lehet ezen ligandum inaktivitásában. Ugyanakkor a méréseink alapján nem lehet pusztán a vas(II)komplexek stabilitása és a ligandumok biológiai aktivitása között lineáris kapcsolatot feltételezni, a ligandumok vas(III)komplexeinek is kellően stabilnak kell lennie. Feltehetően ez is szükséges ahhoz, hogy reverzibilis redoxi folyamatokban (Fenton-típusú) részt tudjanak venni a ligandum vaskomplexei. Pl. a 3-N-metil-Triapine ugyan a vas(II)ionnal stabilis komplexeket képez, de a vas(III)ionnal nem, mert a ligandumot a vas(III) oxidálja. Ez indokolhatja ezen vegyület csekély citotoxicitását. [MS-4]

iii) Mivel az előző vizsgálataink azt mutatták, hogy a vanádiumionok számára az (O,N,S<sup>-</sup>) koordinációs mód a kedvezőbb (ld. i) pont), ezért a stabilitás további növelése érdekében előállítottunk két piridoxál származékát a szalicilaldehid tioszemikarbazonnak. Azonban ez a stabilitásnövekedés egyedül a vanádium(IV) komplexek esetén volt számottevő, a vanádium(V) és réz(II) esetén a stabilitás lecsökkent. [MS-3]

iv) Korábbi vizsgálataink is mutatták, hogy a tioszemikarbazonok N-terminális dimetilézése a biológiai aktivitás és a fémkötő sajátságok növekedését eredményezi. A metilcsoport szerepének alaposabb vizsgálata érdekében szisztematikusan változtattuk ezen szubsztituens helyzetét. A kapott vegyületek mindegyike citotoxikusnak bizonyult különböző humán rákos sejtvonalon, a legnagyobb aktivitást (IC<sub>50</sub> ~ 0.007-0.04 μM) az a származék mutatta, melyben az N-terminális aminocsoport mellett a piridingyűrű 3-aminocsoportja is dimetilézett volt. [MS-2]

v) Részletesen vizsgáltuk fent említett kobalt(III) komplex és ligandumának kölcsönhatását humán szérum albuminnal, valamint az alapvázukban hasonló afatinib, erlotinib és gefitinib gyógyszermolekulákat is bevontuk. Az összehasonlító vizsgálatokhoz a vegyületek korlátozott vízoldhatósága miatt csak fluorimetriás méréseket tudtuk végezni. NMR és ultraszűrési vizsgálataink sikertelenek voltak. „Steady-state” Trp-214 kvencseléses mérésekkel monitoroztuk a fehérje I. kötőhelyén való kölcsönhatásokat, valamint warfarin és danzil-glicin fluoreszcens markerekkel való kompetíciót is vizsgáltuk az I. és II. kötőhelyeken. Élettartam méréseket is végeztünk, melyek segítségével a kötőhelyek számára tudtunk következtetni; valamint a marker kiszorításos kísérletek esetében a kötőhelyekért való tényleges versengést mutattuk ki ezzel a módszerrel. A mérések azt mutatták, hogy a vegyületek kötődése elsősorban az I. kötőhelyen történik meg közepes erősséggel. A munkánkkal párhuzamosan egyik együttműködő partnerünk molekula mechanikai számításokat is végez a fehérjén való kötődés helyének és erősségének alátámasztása érdekében.

**Nemzetközi referált tudományos folyóiratokban megjelent vagy közlésre előkészített publikáció:**

[MS-1] Christian R. Kowol, Nóra V. Nagy, Tamás Jakusch, Alexander Roller, Petra Heffeter, Bernhard K. Keppler, Éva A. Enyedy

*Vanadium(IV/V) complexes of Triapine and related thiosemicarbazones: synthesis, solution equilibrium and bioactivity*

JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY 152 (2015) 62-73.

IF: 3.444; DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2015.08.023

**[MS-2] Christian R. Kowol**, Walter Miklos, Sarah Pfaff, Sebastian Kallus, Sonja Hager, **Karla Pelivan**, Mario Kubanik, **Éva A. Enyedy**, Michael Grusch, Walter Berger, Petra Heffeter, Bernhard K. Keppler  
*Impact of stepwise NH<sub>2</sub>-methylation on Triapine properties and anticancer activity*  
JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY (beküldött kézirat)

**[MS-3] Tamás Jakusch**, Károly Kozma, **Éva A. Enyedy**, **Christian R. Kowol**, Nóra V. Nagy, Alexander Roller, Bernhard K. Keppler, Tamás Kiss  
*Vanadium(IV/V) and copper(II) complexes of two pyridoxal thiosemicarbazones: synthesis and solution equilibria*  
(közlésre előkészítve)

**[MS-4] Éva A. Enyedy**, **Christian R. Kowol**, Petra Heffeter, Bernhard K. Keppler  
*Impact of the type of the chalcogen atom of semicarbazone derivatives of Triapine on the bioactivity and solution stability of their iron(II/III) and copper(II) complexes*  
(közlésre előkészítve)

#### **Nemzetközi/hazai konferencián bemutatott előadás és poszter:**

**[K-1] Nora Veronika Nagy**, **Éva Anna Enyedy**, **Christian R. Kowol**, Felix Bacher, Tamás Kiss, Antal Rockenbauer, Vladimir B. Arion (poszter)  
*Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy to determine structural and solution equilibrium data of copper(II) complexes with anticancer prospects*  
12th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 2014.08.24-28., Zürich, Svájc

**[K-2] Josef Mayr**, Verena Pichler, Petra Heffeter, **Orsolya Dömötör**, **Éva A. Enyedy**, Gerrit Hermann, Diana Groza, Gunda Kollensperger, Markus Galanski, Walter Berger, Bernhard K. Keppler, **Christian R. Kowol** (poszter)  
*Synthesis and characterization of bis-maleimide-functionalized platinum(IV) complexes for tumor-targeted drug delivery*  
12th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 2014.08.24-28., Zürich, Svájc

**[K-3] Bodnár László** (előadás, témavezető: Enyedy Éva Anna)  
*Triapine származékok réz(II)komplexeinek összehasonlító oldategyensúlyi vizsgálata*  
III. Eötvözet Konferencia, Szeged, 2014.

#### **Szakdolgozat:**

Bodnár László (III. kémia BSc, 2014, témavezető: Enyedy Éva Anna)  
*Triapine származékok réz(II)komplexeinek összehasonlító oldategyensúlyi vizsgálata*

Projektnummer: <b>88öu4</b>		<b>HUF 746.000</b> <b>EUR 1.140</b>
Antragsteller: <b>Dr. Éva Anna Enyedy</b>	Institut: <b>Institut für Anorganische und Analytische Chemie</b>	
Projektpartner: <b>Dr. Christian Kowol</b>	Institut: <b>Universität Wien, Institut für Anorganische Chemie</b>	
Titel: <b>Novel anticancer thiosemicarbazone compounds: development and characterization</b>		

**Art der Förderung:**

- Workshop, Konferenz
- Publikation, Lehrmaterial
- **Forschungsprojekt**
- Unterrichtsprojekt

**Bericht**

The main goal of the project was the development of novel thiosemicarbazone compounds and the characterization of their solution equilibrium processes and biological activity. Besides the desired increased antitumor effect we also were intent on the description of the complexation reactions of the novel ligands with iron(II/III) ions in solution, which has a profound effect on the mechanism of action via the inhibition of the ribonucleotide reductase enzyme. Additionally we also characterized and analyzed the relationship between the solution stability and biological activity of the copper(II) and vanadium(IV/V) complexes of the novel thiosemicarbazones. The redox properties of the copper(II) complexes were also compared: their oxidizing power was measured directly with physiological reductants.

Triapine is excreted quickly from the human body. Therefore, we modified the molecule to be able to bind to the human serum albumin specifically; consequently the circulation time of the drug in the blood stream, thus the chance of the tumor uptake can be increased. The derivatization of Triapine was successful, however, the octyloxy-phenyl substituent at the N-terminal (which could be responsible for the binding to the protein) results in a drastic decrease in the water solubility of the compound why we could not investigate its albumin binding in solution by our experimental methods (fluorometry, ultrafiltration, NMR spectroscopy). This was the reason why the common work was continued on a more promising, but different research topic. A novel cobalt(III) complex was developed in the laboratory of the Austrian research group, which contains a ligand being an efficient tyrosine kinase (EGFR) inhibitor. The complex is activated only under the hypoxic condition of the tumor tissues. The effector ligand is liberated from the cobalt(II) complex, which is more labile and less stable compared to the cobalt(III) species, formed under this reducing condition [C. Karnthaler-Benbakka, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 53, 1-7]. Within the confines of the present project the interaction of this cobalt(III) complex and other three approved tyrosine kinase inhibitor drugs and human serum albumin was studied and compared as well.

The common work of the two research groups in this joint project resulted in numerous new results, although the majority of the results is under preparation for publication. Till now one common paper has been published, but three other ones are submitted or prepared for publication. Besides the results were presented at 2 international and 1 national conferences and a B.Sc. thesis was also prepared. The most important results are divided into three topics such as: i) vanadium(IV/V) complexes of  $\alpha$ -N-pyridyl and salicylaldehyde thiosemicarbazones; ii) complexation of O/Se and 4-N-methyl Triapine derivatives with iron(II/III) and copper(II) ions; iii) complex formation of pyridoxal thiosemicarbazones with vanadium(IV/V) and copper(II) ions; iv) effect of methylation of NH<sub>2</sub> groups of Triapine on the biological activity; v) interaction of tyrosine kinase inhibitors with human serum albumin.

i) We have determined the stoichiometry and solution stability of vanadium(IV/V) complexes formed with Triapine and its two N-terminally dimethylated derivatives by the means of pH-potentiometry, EPR and <sup>51</sup>V NMR spectroscopy. Dimethylation increased significantly the

stability of these metal complexes. Three complexes were prepared in solid phase and well. The *in vitro* cytotoxicity measurements displayed that the coordination of the metal ions did not increase the intrinsic activity of the ligands. Therefore studies on salicylaldehyde thiosemicarbazone were also involved. This ligand provides an (O-,N,S-) coordination mode instead of the (N,N,S-) due to the binding of the phenolic-OH moiety instead of the pyridyl-N. This exchange of the donor atom set increased the solution stability of the vanadium complexes unambiguously and the vanadium(V) complex of the salicylaldehyde thiosemicarbazone was found to be more cytotoxic than the ligand. [MS-1]

ii) The exchange of the sulfur donor atom in the Triapine molecule to oxygen or selenium can fundamentally influence the metal binding ability of the ligand. The (N,N,O-) and (N,N,Se-) coordination modes resulted in a lower and a higher copper(II) complex stability, respectively compared to the (N,N,S-) donor set. Surprisingly the 3-N-methylation resulted in an increased stability of the copper(II) complex, though this ligand is not able to bind as an anion. Fundamental differences were also found in the composition of the copper(II) complexes of these ligands. The oxo-, seleno- and 3-N-methyl-Triapine form mono-ligand complexes exclusively, while Triapine can form bis-ligand and dimeric species additionally. Large difference was found in the oxidizing power of the copper(II) complexes of these ligands. Glutathione is able to reduce the copper(II) complexes of all the above mentioned ligands, but in the case of the Triapine and its seleno derivative the reaction is slower. The ascorbate, which is a weaker reducing agent, is able to reduce only the complex of the oxo-Triapine. These difference may have importance in the biological activity of these copper(II) complexes. The studied ligands show differences in their complexation reactions with iron(II/III) ions. E.g. the affinity of oxo-Triapine towards iron(II) ions is fairly low, which may have an impact on the low cytotoxicity of the ligand. At the same time, no linear correlation was found based between the iron(II) complex stability and biological activity of the ligands based on our stability data. Since an adequately high stability of the iron(III) complex is also required for undertaking in reversible redox processes (such as Fenton-type reactions). E.g. the 3-N-methyl-Triapine forms a high stability complex with iron(II) but not with iron(III) as the ligand is oxidized by iron(III) ions. This can be the explanation for the quite low cytotoxicity of the ligand. [MS-4]

iii) Since our previous results showed that the (O-,N,S-) coordination mode is more favorable for the vanadium ions (see section i)), in order to increase the stability further two pyridoxal derivatives of the salicylaldehyde thiosemicarbazone were prepared. Although the increased stability was observed only in the case of the vanadium(IV) ions, but stability was decreased of the vanadium(V) and copper(II) complexes. [MS-3]

iv) Our previous studies also showed that the N-terminally dimethylation of thiosemicarbazones increases the biological activity and the metal binding ability. To reveal the role of the methyl group the position of this substituent was changed systematically on the reference Triapine molecule. The obtained compounds were cytotoxic against human cancer cell lines, and the highest activity ( $IC_{50} \sim 0.007-0.04 \mu M$ ) was found in the case of the derivative which was dimethylated at both the amino groups at the N-terminal and at the position 3 of the pyridine ring. [MS-2]

v) The interaction between the above mentioned cobalt(III) complex, its ligand and human serum albumin was studied in detail and the structurally related approved drugs (afatinib, erlotinib and defitinib) were also involved. Due to the limited water solubility of these compounds the comparative studies were performed only by fluorometry. Our trials with NMR and ultrafiltration methods failed. Steady-state Trp-214 quenching measurements were performed to monitor the interaction at site I of the protein, and warfarin and dansyl glycine fluorescent probes were used in competition studies at sites I and II, respectively. Life-time fluorescence measurements were also performed to investigate the number of binding sites and in the case of the displacement reaction with the site markers we could point out real competition between the markers and the studied compounds for the particular binding sites. Our results showed that the binding of the studied compounds takes place mainly at site I with moderate affinity. In line with our work one of our

collaborators performs molecular mechanical calculations to characterize the binding strengths and sites on the protein.

#### **Common Papers (peer-reviewed) in Scientific Journals or prepared for submission:**

**[MS-1] Christian R. Kowol**, Nóra V. Nagy, Tamás Jakusch, Alexander Roller, Petra Heffeter, Bernhard K. Keppler, **Éva A. Enyedy**

*Vanadium(IV/V) complexes of Triapine and related thiosemicarbazones: synthesis, solution equilibrium and bioactivity*

JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY 152 (2015) 62-73.

IF: 3.444; DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2015.08.023

**[MS-2] Christian R. Kowol**, Walter Miklos, Sarah Pfaff, Sebastian Kallus, Sonja Hager, **Karla Pelivan**, Mario Kubanik, **Éva A. Enyedy**, Michael Grusch, Walter Berger, Petra Heffeter, Bernhard K. Keppler

*Impact of stepwise NH<sub>2</sub>-methylation on Triapine properties and anticancer activity*

JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY (submitted paper)

**[MS-3] Tamás Jakusch**, Károly Kozma, **Éva A. Enyedy**, **Christian R. Kowol**, Alexander Roller, Bernhard K. Keppler, Tamás Kiss

*Vanadium(IV/V) and copper(II) complexes of two pyridoxal thiosemicarbazones: synthesis and solution equilibria*

(prepared for publication)

**[MS-4] Éva A. Enyedy**, **Christian R. Kowol**, Petra Heffeter, Bernhard K. Keppler

*Impact of the type of the chalcogen atom of semicarbazone derivatives of Triapine on the bioactivity and solution stability of their iron(II/III) and copper(II) complexes*

(prepared for publication)

#### **International and National Conferences:**

**[K-1] Nora Veronika Nagy**, **Éva Anna Enyedy**, **Christian R. Kowol**, Felix Bacher, Tamás Kiss, Antal Rockenbauer, Vladimir B. Arion (poster)

*Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy to determine structural and solution equilibrium data of copper(II) complexes with anticancer prospects*

12th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 2014.08.24-28., Zürich, Svájc

**[K-2] Josef Mayr**, Verena Pichler, Petra Heffeter, **Orsolya Dömötör**, **Éva A. Enyedy**, Gerrit Hermann, Diana Groza, Gunda Kollensperger, Markus Galanski, Walter Berger, Bernhard K. Keppler, **Christian R. Kowol** (poster)

*Synthesis and characterization of bis-maleimide-functionalized platinum(IV) complexes for tumor-targeted drug delivery*

12th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 2014.08.24-28., Zürich, Svájc

**[K-3] Bodnár László** (lecture, supervisor: Éva Anna Enyedy)

*Triapine származékok réz(II)komplexeinek összehasonlító oldategyensúlyi vizsgálata*

*(Comparative solution equilibrium studies of copper(II) complexes of Triapine derivatives)*

3rd Eötvözet Conference, Szeged (Hungary), 2014.

#### **Thesis:**

László Bodnár (III. Chemistry BSc, 2014, supervisor: Éva Anna Enyedy)

*Triapine származékok réz(II)komplexeinek összehasonlító oldategyensúlyi vizsgálata*

*(Comparative solution equilibrium studies of copper(II) complexes of Triapine derivatives)*