

TEZĂ DE ABILITARE

Noi complecși ai Cu(II) cu activitate antitumorală și SOD-mimetică. Sinteza, caracterizarea structurală și activitatea biologică.

---

Conf. Dr. **Adriana Hangan**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## REZUMAT

Teza de abilitare "Noi complecși ai Cu(II) cu activitate antitumorală și SOD-mimetică. Sinteza, caracterizarea structurală și activitatea biologică", reprezintă o descriere sintetică a activității științifice, profesionale și academice a d-nei conf. univ. dr. Adriana Corina Hangan, desfășurată după susținerea tezei de doctorat în anul 2005.

O parte importantă a cercetărilor s-a desfășurat în domeniul chimiei bioanorganice, o ramură interdisciplinară ale cărei tendințe actuale oferă posibilități autentice pentru sinteza unor noi agenți terapeutici. Obiectivul principal al activității de cercetare l-a reprezentat obținerea unor noi compuși coordinativi ai Cu(II) cu activitate antitumorală și SOD-mimetică în vederea introducerii lor în terapie ca potențiali agenți antitumorali. În acest sens, am realizat sinteza, caracterizarea structurală și studii de activitate biologică *in vitro* și *in vivo* ale unor combinații complexe ale Cu(II) cu liganzi de tip sulfonamide N-substituite.

S-au sintetizat și caracterizat fizico-chimic nouă sulfonamide N-substituite, derivați de tiadiazol. Formulele de structură pentru liganzii sulfonamidici au fost atribuite în urma analizei elementale și datelor spectrale (difracție cu raze X pe monocristal, IR, spectrometrie de masă, UV-Vis,  $^1\text{H-RMN}$ ). Liganzii nou sintetizați prezintă numeroase puncte de coordinare și ca urmare au fost utilizați la sinteza unor combinații complexe ale ionului de Cu(II).

Ulterior, s-au sintetizat și caracterizat fizico-chimic complecși ai Cu(II) având ca liganzi sulfonamidele nou sintetizate alături de alte molecule introduse în mediul de reacție de tipul piridină, fenantrolină sau dimetilformamidă. Structurile acestor complecși metalici au fost determinate prin difracție ce raze X pe monocristal. Rezultatele analizei cristalografice indică, în general, un raport de combinare ion Cu(II) : ligand sulfonamic de 1 : 2. Ligandul sulfonamic se deprotonează la azotul din gruparea sulfonamică și funcționează ca ligand monodentat, printr-un atom de azot N<sub>tiadiazolic</sub>. Spectrele IR, UV-Vis pe probe solide, spectrele RES, momentele magnetice efective calculate din susceptibilitățile magnetice confirmă modul de coordinare al liganzilor precum și geometria acestor compuși, așa cum a fost prezentată în descrierea structurii cristaline a fiecărui complex.

S-a studiat scindarea moleculei de ADN în prezența noilor complecși, iar rezultatele au indicat o activitate nucleazică superioară a compușilor coordinativi obținuți în comparație cu ionul de Cu(II) necoordinat sau cu ligandul liber. Complecșii în care la coordonarea ionului de Cu(II) participă și molecula de fenantrolină prezintă activitate nucleazică la concentrații mult inferioare altor compuși similari. Studiile de activitate nucleazică efectuate în prezența unor agenți inhibitori au permis stabilirea speciilor reactive de oxigen implicate în distrugerea moleculei de ADN. Radicalii HO· și

anionul radical superoxid  $O_2^{\cdot -}$ , sunt responsabili de scindarea moleculei de acid nucleic, iar concomitent are loc reducerea ionului de Cu(II) la Cu(I). Mecanismul prin care compușii distrug molecula de ADN, este unul oxidativ, ce implică reacții de tip Fenton sau Haber-Weiss.

În urma colaborării cu USAMV Cluj-Napoca, s-au realizat studiile *in vitro* și *in vivo* pentru demonstrarea activității antitumorale a complexilor sintetizați. Evaluarea *in vitro* a activității antitumorale s-a realizat pe următoarele linii celulare WM35, B16F10, D407, A2780 cis, A2780, HeLa, HFL1. Efectul citotoxic al complexilor a fost demonstrat utilizând testul MTT, unii dintre aceștia prezentând activitate citotoxică superioară citostaticelor folosite ca și referință (Cisplatin sau Doxorubicină).

În ceea ce privește studiul activității antitumorale *in vivo* a fost evaluat potențialul antitumoral al complexului demonstrat a fi cel mai activ în urma studiilor *in vitro*, utilizând un model tumoral transplantabil pe șoareci de laborator, EAC inoculat intraperitoneal. Investigațiile nu au fost focusate doar pe urmărirea parametrilor de proliferare tumorală, ci și pe evaluarea efectelor secundare provocate de dezvoltarea tumorii asupra stării generale de sănătate, respectiv pe toxicitatea compusului. Complexul prezintă un efect antiproliferativ semnificativ asupra EAC inoculat la șoarecii de laborator și un grad acceptabil de toxicitate.

Activitatea SOD-mimetică *in vitro* s-a realizat utilizând o metodă spectrofotometrică, iar pentru complexii testați s-a determinat  $IC_{50}$ , care ulterior s-a comparat cu valoarea corespunzătoare enzimei SOD. Noii compuși prezintă activitate SOD-mimetică superioară sării de Cu(II), dar inferioară enzimei superoxidismutază. Activitatea antioxidantă a complexilor de Cu(II) testați se poate datora faptului că aceștia pot participa la ciclul redox pe care enzima îl catalizează în organism și, prin urmare, pot acționa ca și captatori de anion superoxid.

Testarea activității SOD-mimetice *in vivo* s-a realizat prin inducerea unor condiții de stres oxidativ tulpinilor de *S. cerevisiae* sod1 și studierea în ce măsură complexii testați completează deficiențele enzimei SOD din aceste tulpini. Trei dintre complexii de Cu(II) pot fi considerați agenți eficienți împotriva toxicității anionului radical superoxid. Aceștia sunt capabili să substituie deficiența enzimei  $Cu_2Zn_2SOD$  și pot fi testați ca potențiali agenți terapeutici în prevenirea și tratamentul bolilor mediate de radicalii liberi.

Utilizând metoda prezentată mai sus, s-a realizat studiul comparativ al activității antioxidante pentru speciile *Centaurea cyanus*, *Calendula officinalis*, *Salvia officinalis* L. și *Verbascum phlomoides* L. Cele patru extracte sunt capabile să protejeze eficient împotriva anionilor radical superoxid, iar extractul de *Salvia officinalis* L. prezintă o activitate SOD-mimetică superioară celorlalte. Rezultatele sunt încurajatoare, ceea ce face posibilă continuarea studiilor în vederea introducerii acestor extracte în terapie.

Activitatea științifică s-a concretizat prin publicarea după susținerea tezei de doctorat a 22 articole în extenso în reviste cotate ISI (14 în calitate de autor principal),

7 articole in extenso în reviste BDI (în calitate de co-autor), 1 carte de specialitate și alte 9 cărți de teste pentru admitere la Facultatea de Farmacie și la specializarea Nutriție și Dietetică, la Editura Medicală Universitară "Iuliu Hațieganu". Indicele Hirsch este 7, atât conform platformei ISI Thomson, cât și Scopus. După susținerea tezei de doctorat, am fost director al unui grant național obținut prin competiție, respectiv membru în alte 3 proiecte naționale de cercetare și mentor în cadrul unui proiect de cercetare (grant intern). În perioada post-doctorală am participat la numeroase manifestări științifice naționale și internaționale.

În ceea ce privește activitatea didactică, aceasta am desfășurat-o în cadrul Disciplinei de Chimie Generală și Anorganică și a inclus cursuri, respectiv lucrări practice de chimie generală și anorganică cu studenții anului I, secția română și franceză de la Facultatea de Farmacie și studenții anului I de la specializarea de Nutriție și Dietetică. Ca răspuns la solicitările UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, am participat ca și membru în comisiile de elaborare a subiectelor de admitere la Facultatea de Farmacie și specializarea Nutriție și Dietetică începând cu anul 2008. De asemenea, am fost implicată activ în simularea acestui examen prin predarea cursurilor de pregătire și elaborare de subiecte. Ca parte a activității didactice am coordonat 10 lucrări de licență și am elaborat materiale didactice pentru cursurile și lucrările desfășurate.

Pe plan științific, împreună cu grupul de cercetare din care fac parte, ne propunem dezvoltarea direcțiilor de cercetare abordate de la susținerea tezei de doctorat până în prezent, în ceea ce privește sinteza și caracterizarea structurală a unor noi complecși metalici cu diferite activități biologice (antitumorală, antioxidantă, antiinflamatoare, bacteriană, etc) cu o toxicitate redusă și o bună biodisponibilitate. Aceasta implică introducerea pe o moleculă suport, cu pondere bioactivă, de grupări farmacofore, alegerea corespunzătoare a ionilor metalici generatori de complecși și optimizarea condițiilor de sinteză a complecșilor metalici. Evidențierea activității biologice se va face atât prin studii *in vitro* cât și *in vivo*. Studiile de spectroscopie de fluorescență, de denaturare termică a moleculei de ADN și de vâscozimetrie vor preceda testarea activităților biologice și vor completa foarte bine mecanismul de acțiune al complecșilor obținuți asupra moleculei de ADN. Problema solubilizării în diferite medii (solvenți) rămâne o provocare în ceea ce privește sinteza unor complecși ai Cu(II) și nu numai, care sunt testați din punct de vedere al activității biologice. Ca urmare, pentru compușii sintetizați și caracterizați care prezintă probleme de solubilitate se vor încerca alte metode prin care ei să poată fi utilizați în studiile *in vitro* sau *in vivo*. În acest sens cercetările vor fi orientate spre: obținerea unor complecși de incluziune de tipul ciclodextrină-complex metalic sau sinteza și caracterizarea unor sisteme de livrare pentru compuși bioactivi, nanoparticulele (NP). Acestea din urmă oferă posibilitatea controlului solubilității, a stabilității, a biodisponibilității și a cedării compusului bioactiv încapsulat. Obținerea de nanoparticule de aur (sau Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> și Au) cu complecși de Cu(II) biologic activi ajută la creșterea stabilității și biodistribuției acestora din urmă în mediile biologice. Utilizarea acestora face posibilă reducerea dozei de agent terapeutic administrat și implicit efectele secundare ale acestuia.

Odată obținuți, caracterizați și testați din punct de vedere al activității biologice compușii cei mai activi vor fi analizați din punct de vedere al toxicității și al manifestării activității biologice *in vivo* în vederea introducerii lor în terapie. Mai mult decât atât, coroborarea metodelor empirice de screening cu cunoștințe noi provenind din cercetarea genomului și proteomului ar putea fi cea mai eficientă cale de urmat pentru a identifica alte obiective promițătoare și în ceea ce privește mecanismul de acțiune al complexilor metalici. Aceste informații ar putea permite de la simpla sinteză a agenților citotoxici, cu mecanisme necunoscute de acțiune, la proiectarea rațională a substanțelor medicamentoase bazate pe compleși metalici și nu numai.

În concordanță cu interesul pentru stresul oxidativ, se vor continua și studiile fitochimice, urmărind caracterizarea diverselor specii de plante în vederea identificării unor surse bogate în compuși cu potențial rol antioxidant, ce pot fi utilizați ca materie primă pentru obținerea de noi produse farmaceutice.

Pentru a realiza planul de cercetare propus avem nevoie de infrastructură, resursa umană și resurse materiale. Asigurarea și îmbogățirea resursei umane poate fi realizată prin : implicarea absolvenților facultății noastre și nu numai în activitatea de cercetare și dezvoltarea de noi colaborări cu echipe de cercetare din țară sau din străinătate în vederea unei cât mai bune valorificări a complexilor obținuți. Infrastructura și resursele materiale necesare pot fi asigurate prin : creșterea numărului de proiecte de cercetare cu finanțare, câștigate prin competiție, inclusiv proiecte internaționale și/sau prin atragerea de proiecte de tip parteneriat, implicarea în echipe internaționale de cercetare și crearea de parteneriate cu mediul de afaceri pentru inițierea de proiecte comune și valorificarea rezultatelor cercetării. Planul de diseminare al rezultatelor cercetării științifice cuprinde: prezentarea acestora la manifestări științifice naționale și internaționale, publicarea de articole în reviste cotate ISI (de dorit Q1 sau Q2), redactarea unei monografii având ca subiect importanța biomedicală a combinațiilor complexe, brevetarea compușilor obținuți sau utilizarea complexilor metalici obținuți în formulări farmaceutice, dacă rezultatele o vor permite.

În ceea ce privește activitatea didactică, obiectivele au în vedere integrarea în cadrul cursurilor și laboratoarelor, în permanență, a informațiilor noi apărute în domeniul nostru de activitate (profesia de farmacist), corelarea aplicațiilor practice cu informațiile teoretice prezentate, redactarea de materiale didactice și dezvoltarea și utilizarea de tehnici moderne de predare. Totodată, rămâne esențială obținerea feedbackului și sugestiilor venite din partea studenților în scopul îmbunătățirii continue a actului didactic în vederea formării unor viitori profesioniști în domeniul farmaceutic.

## ABSTRACT

The habilitation thesis entitled "New Cu(II) complexes with antitumor and SOD-mimetic activity. Synthesis, structural characterization and biological activity" represents a synthetic description of the scientific, professional and academic activity of Ms. Associate Professor Phd Adriana Corina Hangan, activity held after defending the doctoral thesis in 2005.

An important part of the research was carried out in the field of bioinorganic chemistry, an interdisciplinary branch whose current tendencies offer authentic possibilities for the synthesis of new therapeutic agents. The main objective of the research activity was to obtain new coordinating compounds of Cu (II) with antitumor and SOD-mimetic activity in view of their introduction into therapy as potential antitumor agents. For this purpose, synthesis, structural characterization and *in vitro* / *in vivo* biological activity studies of complex combinations of Cu (II) with N-substituted sulfonamide ligands have been performed.

Nine new N-substituted sulfonamides, thiadiazole derivatives, have been synthesized and physico-chemically characterized. Structure formulas for sulfonamide ligands were assigned following elemental analysis and spectral data (X-ray diffraction on monocrystal, IR, mass spectrometry, UV-Vis,  $^1\text{H-RMN}$ ). The newly synthesized ligands have many coordination points and have therefore been used in the synthesis of complex combinations of Cu (II) ion.

Subsequently, Cu (II) complexes having newly synthesized sulfonamide ligands together with other molecules introduced into the reaction medium such as pyridine, phenanthroline or dimethylformamide have been synthesized and physico-chemically characterized. Structures of these metal complexes were determined by single crystal X-ray diffraction. The results of the crystallographic analysis generally indicate a combination ratio of ion Cu (II):sulfonamide ligand = 1:2. The sulfonamide ligand is deprotonated to the nitrogen from the sulfonamide group and functions as a monodent ligand. The only atom in the molecule involved in Cu (II) ion coordination is one of the N-thiadiazolic nitrogen atoms. IR and UV-Vis spectra on solid samples, RES spectra, the actual magnetic moments calculated from the magnetic susceptibilities confirm the coordination mode of the ligands, as well as the geometry of these compounds, as presented in the description of the crystalline structure of each complex.

DNA denaturation was studied in the presence of synthesized complexes and reductants, and the results indicated a superior nuclease activity for the obtained coordinate compounds compared to uncoordinated Cu (II) ion or free ligand. Complexes in which the phenanthroline is involved in Cu (II) ion coordination exhibit nuclease activity at concentrations much inferior to other similar compounds. Nuclease activity studies performed in the presence of inhibitory agents allowed the establishment of reactive oxygen species involved in the destruction of the DNA molecule.  $\text{HO}\cdot$  and  $\text{O}_2^{\cdot-}$

radicals are responsible for the cleavage of the nucleic acid molecule, and a common step in this process is the reduction of the Cu (II) ion to Cu (I). The mechanism by which the compounds destroy the DNA molecule is an oxidative one, involving Fenton or Haber-Weiss reactions.

Following the collaboration with USAMV Cluj-Napoca, *in vitro* and *in vivo* studies were conducted to demonstrate the antitumor activity of the newly synthesized complexes. *In vitro* evaluation of antitumor activity was performed on the following cell lines: WM35, B16F10, D407, A2780 cis, A2780, HeLa, HFL1.

The cytotoxic effect of Cu (II) complexes was demonstrated using the MTT assay. Some of the new Cu (II) complexes show cytotoxic activity superior to the cytostatics used as a reference (Cisplatin or Doxorubicin). Comparative studies on normal cells have demonstrated the lack of toxicity of these complexes following the *in vitro* tests.

With regard to the study of *in vivo* antitumor activity, the antitumor potential of the complex was evaluated. It was demonstrated to be the most active in *in vitro* studies, using a transplantable tumor model on laboratory mice, EAC inoculated intraperitoneally. The investigations were focused not only on tracking tumor proliferation parameters, but also on assessing the side effects caused by tumor development on the overall health status and the toxicity of the compound. The complex has a significant antiproliferative effect on EAC inoculated in laboratory mice and an acceptable degree of toxicity.

*In vitro* SOD-mimetic activity was performed using a spectrophotometric method, and for the complexes tested, the IC<sub>50</sub> was determined, value which was then compared to the SOD enzyme value. The new compounds exhibit a SOD mimetic activity superior to the Cu (II) salt, but inferior to the superoxide dismutase enzyme. The antioxidant activity of the tested Cu (II) complexes may be due to the fact that they can participate in the redox cycle, which in the body is catalysed by the enzyme and can therefore act as superoxide anion collectors.

Testing SOD-mimetic activity *in vivo* was performed by inducing oxidative stress conditions for *S. Cerevisiae* sod1 strains and studying to what extent the tested complexes complete the deficiencies of the SOD enzyme from these strains. Three of the Cu (II) complexes can be considered as effective agents against the toxicity of the radical superoxide anion, significantly improving the growth of the sod1 strain. They are able to substitute the enzyme Cu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>SOD deficiency and can be tested as potential therapeutic agents in the prevention and treatment of free radical mediated diseases.

Using the above method, a comparative study of the antioxidant activity for *Centaurea cyanus*, *Calendula officinalis*, *Salvia officinalis* L. and *Verbascum phlomoides* L. was performed. The four extracts are able to protect efficiently against the radical superoxide anions. The extract of *Salvia officinalis* L. has a SOD mimetic activity superior to the others. The results are encouraging, which makes it possible to continue the studies to introduce these extracts into therapy.

The scientific activity of the author was materialized by publishing, after the doctoral dissertation, a number of 22 articles in extenso in ISI rated journals (14 as

principal author), 7 articles in extenso in BDI journals (as co-author), 1 specialty book and another 9 admission tests books at the Faculty of Pharmacy and at the Nutrition and Dietetics specialty at "Iuliu Hațieganu" University Medical Publishing House. The Hirsch index is 7, both according to ISI Thomson and Scopus. Following the doctoral dissertation, the author was the director of a national grant obtained through a competition, member of three other national research projects and mentor within a research project (internal grant). During the post-doctoral period she participated at numerous national and international scientific events.

As far as the didactic activity is concerned, it was carried out within the General and Inorganic Chemistry Department and included courses, respectively practical works of General and Inorganic Chemistry, with students of the first year from the Faculty of Pharmacy (Romanian and French language) and first year students from Nutrition and Dietetics specialization, Faculty of Pharmacy. As a response to the requests from UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, she participated as a member of the commissions which elaborate the subjects for admission at the Faculty of Pharmacy and Nutrition and Dietetics specialty since 2008. Also, she was actively involved in the simulation of this exam by teaching the training courses and by elaboration of the admission subjects. As part of her didactic activity she coordinated 10 diploma thesis and developed teaching materials for the conducted courses and practical works.

Scientifically, the author aims to develop the research directions approached since the defence of the PhD thesis until now, regarding the synthesis and structural characterization of new metal complexes with different biological activities (antitumoral, antioxidant, antiinflammatory, bacterial, etc.) with low toxicity and good bioavailability. This involves introducing on a support molecule, with bioactive weight, pharmacophore groups, the appropriate choice of complex metal ions and optimizing the synthesis conditions of metal complexes. To highlight the biological activity, both *in vitro* and *in vivo* studies will be done. Fluorescence spectroscopy, thermal denaturation DNA and viscosity studies will precede the testing of biological activities and will explain and complete very well the mechanism of action of the obtained complexes on the DNA molecule. The solubilization problem in different media (solvents) remains a challenge in the synthesis of Cu (II) complexes and not only, for the complexes which are tested from the point of view of the biological activity. Therefore, for the synthesized and characterized compounds which have solubility problems, other methods will be attempted by which they can be used in *in vitro* or *in vivo* studies. For this purpose, the research will be oriented towards obtaining inclusion complexes of type cyclodextrin-metal complex or synthesis and characterization of delivery systems for bioactive compounds, nanoparticles (NP). The latter provides the possibility of controlling the solubility, stability, bioavailability and release of encapsulated bioactive compound. The production of gold nanoparticles (or Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Au) with biologically active Cu (II) complexes helps to increase their stability and biodistribution in biological environments. Their use makes it possible to reduce the dose of administered therapeutic agent and implicitly its side effects. Once obtained, characterized and tested



---

for biological activity, the most active compounds will be analyzed from the point of view of toxicity and *in vivo* biological activity, for their introduction into therapy. Moreover, corroborating empirical screening methods with new knowledge from genome and proteome research could be the most effective way to identify other promising goals and the mechanism of action of metal complexes. This information could allow from the simple synthesis of cytotoxic agents with unknown mechanisms of action to the rational design of medicinal substances based on metallic complexes and not only.

Consistent with the interest in oxidative stress, phytochemical studies be will continued, following the characterization of various plant species to identify sources rich in potentially antioxidant compounds that can be used as a raw material for new pharmaceutical products.

To achieve the proposed research plan, we need infrastructure, human resources and material resource. Ensuring and enriching the human resource can be achieved by: involving graduates of our faculty (and not only) in the research activity and developing new collaborations with research teams from the country or from abroad, in order to make the best use of the complexes obtained. Infrastructure and material resources can be provided by: increasing the number of funded research projects won through competition, including international projects and / or attracting partnership projects, engaging in international research teams and creating partnerships with the business environment for initiating joint projects and capitalizing on research results. The dissemination plan for scientific research results includes: presenting them at national and international scientific events, publication of articles in ISI-rated journals (Q1 or Q2), drafting a monograph on biomedical importance of complex combinations, patenting of the obtained compounds or use of the obtained metal complexes in pharmaceutical formulations, if the results permit it.

In terms of didactic activity, the objectives are to integrate permanently in the courses and laboratories the new information in our field of activity (pharmacist profession), to correlate the practical applications with the presented theoretical information, to edit the didactic materials and to develop and use the modern teaching techniques. At the same time, it is essential to get feedback and suggestions from students to further improve the teaching process in order to train future pharmaceutical professionals.