

Diss. ETH Nr. 16292

**Thermodynamic and kinetic considerations regarding
oral iron chelators**

Abhandlung zur Erlangung des Titels
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

Martin Merkofer
Dipl. Chem. ETH
geboren am 07. Januar 1974
von Kaisten (AG)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. Willem H. Koppenol, Referent
Prof. Dr. Robert C. Hider, Korreferent
Dr. Reinhard Kissner, Korreferent

2005

SUMMARY

Iron is a trace element for all organisms. There is no regulated excretion of iron, and, therefore, iron homeostasis is regulated only by the absorption in the gastrointestinal tract [1,2]. Chronic iron overload arises under several clinical conditions, for example after blood transfusions for the treatment of certain anemias, in hereditary haemochromatosis or in thalassaemia patients [3,4].

Redox cycling of iron is a critical aspect of iron toxicity. Reduction of a low-molecular-weight iron(III)-complex followed by oxidation of the iron(II)-complex by hydrogen peroxide may yield the reactive hydroxyl radical or an oxoiron(IV) species (the *Fenton* reaction). Complexation of iron that shifts the electrode potential of the complex to either to far below +0.28 V (ascorbyl/monohydroascorbate, pH = 7) [5] or to far above +0.37 V ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{HO}^\bullet$, H_2O , pH = 7) is essential to limit *Fenton* reactivity. Various hydroxypyridinones and the triazole derivative ICL670 are presently in use or under development as oral chelating agents. They effectively remove iron from patients suffering from iron overload. We measured the electrode potentials of the iron(III)-complexes of these drugs with cyclic voltammetry at the mercury hanging drop electrode and determined the dependence on concentration, pH and stoichiometry. The standard electrode potentials measured are between – 535 and – 620 mV (vs NHE).

Conditions *in vivo* are far removed from those of the standard state. The electrode potentials are significantly higher at lower iron and chelator concentrations. At physiological conditions the electrode potentials of these iron-complexes are dependent on the affinities of the ligand for iron(III) and for iron(II); these affinities correlate with the $\text{p}K_a$ -value of the hydroxypyridinone. At high pH, the ratio of the stability constants of the iron(III) and iron(II)-complexes is the crucial factor which determines the electrode potential. Furthermore, an amide group, as in the hydroxypyridinone CP502, shifts the

electrode potential to more positive values due to stabilisation of iron(II). Consequently, the ideal iron chelator from a thermodynamic point of view should have a low pK_a -value and no soft nitrogen donor atom in a side chain that could stabilise iron(II).

We determined that the electrode potential of the iron(III)/iron(II)-CP20 couple is near -150 mV under physiological conditions. The positive shift of the electrode potential is likely to be caused by dissociation of ligand after reduction of the iron(III)-complex. Indeed, binding data show that the iron(II)-complexes of these ligands are not fully formed at physiological pH and low iron concentrations, even when the ligand is present in excess.

A comparison of the biologically relevant electrode potentials of these complexes with those estimated for the dioxygen/superoxide couple ($+136$ mV) and the ascorbyl/monohydroascorbate couple ($+105$ mV) shows, that from a thermodynamic point of view, all ligands mentioned above should prevent redox cycling, as long as the iron(III) L_3 -complexes and the iron(III) L_2 -complex of the hydroxypyridinones and ICL670, respectively, are fully formed. For incompletely formed complexes reduction could be feasible.

Based on our electrochemical measurements, ligand dissociation should take place after reduction of the iron(III)(cp20) $_3$ -complex. By pulse radiolysis, we could show that the rate constant for this process is $(8 \pm 1) \times 10^3$ s $^{-1}$. The second-order rate constant for the reduction of the iron(III)(cp20) $_3$ -complex by hydrated electrons is $(6.4 \pm 0.3) \times 10^{10}$ M $^{-1}$ s $^{-1}$. The dioxocarbonate($\bullet 1^-$) radical does not reduce iron(III)(cp20) $_3$ although from a comparison of the electrode potential of the iron(III)/(II)(cp20) $_3$ -complex, -0.62 V, with that of the carbon dioxide/dioxocarbonate($\bullet 1^-$) couple, -1.90 V [6], it is clear that a reduction is thermodynamically very favourable. We conclude that the iron(III) is not directly accessible and is reduced via the ligand.

As follows from speciation diagrams, electrochemical studies and pulse radiolysis, iron(II) is not fully complexed at physiological conditions. Consequently, the probability that hydrogen peroxide coordinates to the metal center and undergoes *Fenton* reaction is increased. To decide what happens if reduction of an incompletely formed iron(III)-complex would take place, we determined the reaction rate constant for the reaction of 20 μM iron(II) with an excess of hydrogen peroxide at 25°C and pH 7.2 to be $(6.8 \pm 0.2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and $(8 \pm 1) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ in the presence of 100 μM CP20 and 40 μM CP20, respectively. Thus indeed, such partially formed complexes engage in *Fenton* activity. With increasing pH, the *Fenton* reaction becomes faster. Consequently, the protonation state of CP20 and thereby the stabilisation of the reaction product iron(III) has a large influence on the reaction rate constant of the *Fenton* reaction. The reaction rate constant of hydrogen peroxide with the iron(II)(cp502)-complex is comparable to that of CP20 and seems to be generally valid for that class of ligands. Based on these rate constants, a concentration of 5 μM iron and a steady state concentration of 12 nM hydrogen peroxide, one calculates that 4 nM hydroxyl radicals are produced per second in a liver cell. This reaction would proceed very slowly at these low concentrations of iron(II) and hydrogen peroxide.

Overall conclusion:

The chelating agents are safe as long as iron(III) is fully complexed. If any reduction of lower coordinated complexes would take place, oxidation of the iron(II)-complexes by hydrogen peroxide would proceed very slowly.

ZUSAMMENFASSUNG

Eisen ist für alle Organismen ein lebenswichtiges Spurenelement. Da es keine geregelte Ausscheidung von Eisen gibt, wird das Eisengleichgewicht im Körper durch die Eisenaufnahme im Magen-Darm-Trakt geregelt [1,2]. Chronische Eisenüberschusserkrankungen können durch Bluttransfusionen zur Behandlung von Eisenmangel, bei der vererbten Hämochromatose oder bei Thalassaemie Patienten entstehen [3,4].

Der Redox-Zyklus von Eisen ist für die Eisentoxizität von grosser Bedeutung. Wenn ein Eisen(III)-Komplex reduziert wird, kann der entstandene Eisen(II)-Komplex durch Wasserstoffperoxid wieder oxidiert werden, was die Bildung von Hydroxyl-Radikalen oder einer Oxoeisen(IV)-Spezies zur Folge hat (*Fenton* Reaktion). Um *Fenton* Aktivität zu verhindern ist es wichtig, dass das Elektrodenpotential der Eisen-Chelat Komplexe entweder unterhalb demjenigen von Ascorbyl/Monohydroascorbat (+0.28 V bei pH 7) [5] oder oberhalb demjenigen von Wasserstoffperoxid/Hydroxyl Radikal, Wasser (+0.37 V bei pH 7) liegt. Verschiedene in tablettenform verabreichbare Hydroxypyridinone und das triazol Derivat ICL670 werden bereits klinisch angewendet oder sind in Entwicklung. Diese Medikamente scheiden Eisen effizient aus dem Körper aus. Mittels zyklischer Voltammetrie an einer Quecksilberelektrode haben wir die Elektrodenpotentiale sowie die pH und Konzentrationsabhängigkeit der Eisen(III)-Komplexe dieser Medikamente gemessen. Die Standardelektrodenpotentiale liegen zwischen -535 mV und -620 mV (vs NHE).

Es gilt zu berücksichtigen, dass die Bedingungen *in vivo* weit entfernt sind von Standardbedingungen und die Elektrodenpotentiale bei tiefen Eisenkonzentrationen zu positiveren Werten verschoben werden. Unter physiologischen Bedingungen wird das Elektrodenpotential dieser Komplexe durch die Affinität der Liganden zu Eisen(III) und Eisen(II) bestimmt, was mit

dem pK_a -Wert der Liganden korreliert. Bei hohem pH-Wert ist der ausschlaggebende Faktor für das Elektrodenpotential das Verhältnis der Stabilitätskonstanten der Eisen(III)- und Eisen(II)-Komplexe. Weiter haben wir gesehen, dass eine Amid-Gruppe, wie beim Hydroxypyridinone CP502, das Elektrodenpotential zu positiveren Werten verschiebt. Der Grund dafür ist, dass bei CP502 Eisen(II) durch die Koordination am Stickstoffatom der Amidgruppe stabilisiert wird. Als Schlussfolgerung aus diesen Erkenntnissen kann man sagen, dass der ideale Eisenchelator aus thermodynamischer Sicht einen tiefen pK_a -Wert haben sollte und kein Stickstoffatom in einer Seitenkette, welches Eisen(II) stabilisieren könnte.

Unter physiologischen Bedingungen verschiebt sich das Elektrodenpotential des Eisen(III)/Eisen(II)-CP20 Paares zu -150 mV. Der Grund für die Verschiebung der Elektrodenpotentiale zu positiveren Werten ist eine Liganddissoziation nach der Reduktion der Eisen(III)-Komplexe. Stabilitätsdiagramme zeigen, dass bei tiefem pH und kleiner Eisenkonzentration auch bei Ligandenüberschuss die Eisen(II)-Komplexe im Gegensatz zu den Eisen(III)-Komplexen nicht vollständig gebildet sind.

Ein Vergleich der physiologisch relevanten Elektrodenpotentiale der untersuchten Eisen(III)/Eisen(II)-Chelat Komplexe mit den berechneten von Disauerstoff/Superoxid ($+136$ mV) und Ascorbyl/Monohydroascorbat ($+105$ mV) unter physiologischen Bedingungen zeigt, dass die Eisenkomplexe nicht reduziert werden, solange die Eisen(III) L_3 -Komplexe der Hydroxypyridinone und der Eisen(III) L_2 -Komplex von ICL670 vollständig gebildet sind. Nicht vollständig gebildete Komplexe könnten redoxaktiv sein.

Mittels Pulsradiolyse konnten wir zeigen, dass die vermutete Liganddissoziation nach der Reduktion des Eisen(III)-Komplexes stattfindet. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Dissoziation des Liganden CP20 von Eisen(II) beträgt $(8 \pm 1) \times 10^3 \text{ s}^{-1}$. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der Reduktion des Eisen(III)(cp20) $_3$ -Komplexes mit

hydratisierten Elektronen ist $(6.4 \pm 0.3) \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Die Reduktion findet mit hydratisierten Elektronen, nicht aber mit Dioxocarbonat($\bullet 1^-$) statt, obwohl die Reaktion thermodynamisch begünstigt wäre, da das Standardelektrodenpotential des Eisen(III)/(II)(cp20)₃-Komplexes mit -0.62 V grösser ist als dasjenige des Paares Kohlendioxid/ Dioxocarbonat($\bullet 1^-$) von -1.90 V [6]. Daraus schliessen wir, dass das Eisen(III)-Zentrum nicht direkt reduziert wird, sondern über den Liganden.

Mittels Elektrochemie, Pulsradiolyse und Stabilitätsdiagrammen konnten wir zeigen, dass Eisen(II) unter physiologischen Bedingungen nicht vollständig komplexiert ist mit diesen Liganden. Um zu entscheiden was passiert, wenn ein nicht vollständig gebildeter Eisen(II)-Komplex oxidiert wird, untersuchten wir die *Fenton* Reaktion dieser Komplexe. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Reaktion von $20 \text{ }\mu\text{M}$ Eisen(II) mit einem Ueberschuss Wasserstoffperoxid bei 25°C und $\text{pH } 7.2$ ist $(6.8 \pm 0.2) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $(8 \pm 1) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mit $100 \text{ }\mu\text{M}$, respektive $40 \text{ }\mu\text{M}$ CP20. Die Reaktion wird mit zunehmendem pH-Wert schneller. Somit zeigen diese Eisen(II)-Komplexe also *Fenton* Aktivität. Der Protonierungsgrad von CP20 und die Stabilisierung des Reaktionsproduktes Eisen(III) scheinen einen grossen Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstante dieser Reaktion zu haben. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Reaktion von Wasserstoffperoxid mit dem Eisen(II)(cp502)-Komplex ist vergleichbar mit derjenigen von CP20 und scheint für diese Art Ligand spezifisch zu sein. Unter Verwendung dieser Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten, einer typischen Konzentration an labil gebundenem, redoxaktivem Eisen von etwa $5 \text{ }\mu\text{M}$ und einer Wasserstoffperoxid Steady state Konzentration von 12 nM berechneten wir, dass die Produktion an Hydroxyl Radikalen in einer Leberzelle 4 nM pro Sekunde ist. Diese Reaktion wird aber sehr langsam ablaufen in Anbetracht der kleinen Konzentrationen an Eisen(II) und Wasserstoffperoxid *in vivo*.

Allgemeine Schlussfolgerung:

Die in dieser Arbeit untersuchten Eisen-Chelat Komplexe werden nicht reduziert, solange das Eisen(III)-Ion vollständig komplexiert ist. Falls eine Reduktion von nicht vollständig ausgebildeten Komplexen stattfinden würde, würde die nachfolgende Oxidation der Eisen(II)-Komplexe sehr langsam ablaufen, in Anbetracht der kleinen Konzentrationen an Eisen(II) und Wasserstoffperoxid.